

INVESTIGACIONES ORIGINALES

Ensayo químico y efecto de antibiosis in vitro de la miel de abeja sobre microorganismos grampositivos y gramnegativos

Chemical test and effect of antibiosis in vitro of the honey bee on gramnegative and grampositive microorganisms

CRUZADO RAZCO, Lizardo¹; GUTIERREZ CALDERON, Daisy Paola²; RUIZ REYES, Segundo Guillermo³

RESUMEN

El presente trabajo está orientado a determinar los componentes químicos y el efecto de antibiosis “in vitro” de la miel de abeja, frente a bacterias grampositivas y gramnegativas, comúnmente causantes de enfermedades prevalentes en la población. En el ensayo químico se determinaron metabolitos primarios y secundarios; mediante reacciones químicas correspondientes presentando flavonoides, esteroides y leucoantocianidinas. Para el efecto de antibiosis “in vitro” se empleó el Método de Difusión en Discos– Método de Kirby&Bauer. Los resultados de antibiosis fueron positivos para *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus* y negativo para *Klebsiella pneumoniae*.

Palabras clave: Miel de abeja, antibiosis.

ABSTRACT

The present work is oriented to determine the chemical components and the effect of antibiosis "in vitro" of the honeybee, in front of gram positive and gram negative bacteria commonly causes of prevalent diseases in the population. For the analysis of the chemical screening primary and secondary metabolites were determined; by means of corresponding chemical reactions presenting flavonoids, steroids and leucoantocyanidins. For the antibacterial effect the Kirby - Bauer method was used based on the diffusion of the honey through a layer of agar so solidified in an extension that the growth of sensible microorganisms is inhibited in zones around the disc. The antibiosis results were positive for *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus* and negative for *Klebsiella pneumoniae*.

Key words: Honeybee, antibiosis.

1. Químico Farmacéutico, Profesor de Toxicología categoría Principal. email:revistamedica@ucv.edu.pe

2. Químico Farmacéutico, Regente. email: gtcdaisy14@yahoo.es

3. Profesor de Farmacognosia categoría Auxiliar email: guille_ruiz2001@yahoo.es

INTRODUCCIÓN

Durante milenios, la humanidad no ha tenido a su disposición una sustancia más azucarada que la miel de *Apis mellifera L.*, en adelante denominada miel de abejas, producto natural ha sido fundamental en la vida de nuestros antepasados, utilizaban la miel y cera de abejas con fines alimenticios, cosméticos, terapéuticos y religiosos (1).

El ser humano, siempre ha sido atraído por el sabor dulce; quizá éste, fue uno de los métodos que empleó el hombre primitivo en la selección de alimentos seguros. Los recién nacidos muestran ya una preferencia al dulce que contrasta con su indiferencia al salado y su rechazo al amargo (2).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) proyecta que cerca del 80% de la población mundial emplean la medicina tradicional para sus principales necesidades de atención primaria de salud (3). En nuestro país además el difícil acceso a los medicamentos, impulsa al mayor uso de recursos como la fitoterapia, apiterapia, acupuntura, masajes, ejercicios de relajación, aromaterapia, entre otros. La apiterapia es la disciplina médica que emplea los productos de la colmena para el tratamiento y la prevención de enfermedades (4,5).

La profesión Farmacéutica, motivada a investigar nuevos tratamientos de diversas enfermedades; recibe de la naturaleza los componentes principales para tal efecto, empleando aquellos que por sus propiedades terapéuticas y nutricionales destacan; entre ellas la miel de abeja (6).

China es el líder en producción de miel de abeja con 150,000 toneladas en 1997, seguido por Estados Unidos con 87,000 toneladas. Para el mismo año, China también fue el exportador más grande del mundo con 65,000 toneladas, seguido muy cerca por Argentina. Diez países cuentan con más del 80 % de las importaciones globales de miel, y entre éstos, siete son Europeos. Alemania cuenta con el 26 % de las importaciones mundiales de miel con 90,000 toneladas, actúa muchas veces como el importador principal y exportador a países europeos (7).

Con un potencial de producción de miel importante, el Perú tiene un futuro apícola definido. La diversidad de climas, y una naturaleza libre de industrias y de tratamientos con pesticidas, permite una abundante cosecha de miel y de gran

calidad. En su llanura costera, se encuentra la mayor parte de los apicultores profesionales (8). En el norte de la zona costera del Perú se dan las más importantes cosechas de miel. Con la floración del algarrobo se consiguen cosechas de hasta 45 kg/colmena. Desde la frontera norte con el Ecuador hasta la Provincia de Lambayeque hay grandes extensiones de bosques que crecen sobre la arena de un desierto, estos bosques están constituidos principalmente por árboles de algarrobo con 70% y zapote con 20% y una vegetación menor de matorrales de distintas especies florales (8).

Cajamarca es productora de miel de abeja; a pesar de tener una infraestructura productiva precaria, informal, falta de termificación y apoyo sobre el mercado para su producción (9).

Se entiende por miel el producto alimenticio producido por las abejas melíferas a partir del néctar de las flores, de secreciones procedentes de partes vivas de las plantas o excreciones de insectos succionadores de plantas. Las abejas recogen el néctar lo transforman, combinan con sustancias específicas propias (enzimas), almacenan y dejan madurar en los panales de la colmena (10). La miel es un carbohidrato que necesitan las abejas en todas las etapas de su vida como fuente de energía, las abejas pecoreadoras absorben con su trompa el néctar, luego lo depositan en su buche y lo depositan en la colmena para entregarlo a las obreras jóvenes quienes a su vez lo pasan a su buche y lo regurgitan repetidas veces. De este modo el néctar es enriquecido con fermentos, ácidos, albúminas y por esta razón, la miel es cien por ciento asimilable, ya que está predigerida por las abejas; es un azúcar natural ideal para la alimentación, porque en su composición entran azúcares simples como la glucosa y fructosa, que no necesitan transformación por los tubos digestivos para que sean asimilados (2,8,11,12).

Las abejas *Apis mellifera L.* son insectos del orden de los Himenópteros, en una colmena habitan tres castas de individuos: *la reina, el zángano y las obreras*. Cada cual tiene una función específica y complementaria configurando un cuadro casi perfecto de organización, se hallan mancomunados en su actividad procreadora y productora de alimentos, asegurando su supervivencia (12). La *reina* es la única hembra sexualmente productiva de la comunidad. Su alimento es casi exclusivamente la jalea real, que producen las glándulas hipofaríngeas de las obreras. Las *obreras*, carecen de la capacidad de

aparearse y reproducirse, segregan cera, construyen el panal, recogen néctar, polen y agua, transforman el néctar en miel, limpian la colmena, mantienen la zona de puesta a 34 °C, temperatura óptima para la incubación de los huevos y el desarrollo de las crías; en caso de necesidad, la defienden. Las abejas adultas pueden subsistir a base de miel o azúcar, una dieta de carbohidratos puros. Las larvas son alimentadas con jalea real durante los dos días siguientes y después con polen y néctar o miel. El zángano carece de aguijón y de defensa alguna. Su única función es aparearse con las nuevas reinas, se alimenta de miel y polen (12,13,14).

Las virtudes terapéuticas de la miel descansan en la absoluta inocuidad de este alimento y su perfecta tolerabilidad, incluso en dosis muy elevadas. Su composición química es agua (15% a 20%), glúcidos (fundamentalmente monosacáridos como glucosa y fructuosa; disacáridos, azúcares superiores), la glucosa y fructosa ocupan un 80%-85%; ácidos orgánicos (ácidos glucónico, acético, cítrico, láctico, succínico), sustancias nitrogenadas (aminoácidos y proteínas), lípidos, oligoelementos, enzimas (invertasa, amilasa, catalasa, inhibina, fosfatasa y otras), vitaminas (tiamina, riboflavina, piridoxina, ácido pantoténico, ácido nicotínico, biotina, ácido fólico) (15,16,17).

La miel posee una reacción ácida, debido a la presencia de ácidos orgánicos; su pH registra como promedio el valor de 3,9 (15,17). El ácido glucónico, derivado de la glucosa, es el que prevalece. La miel presenta ventajas frente a los azúcares refinados, estos últimos sin mas propiedad que la de aportar calorías con azúcares dobles más fácilmente convertibles en tejido adiposo y peor asimilables por el organismo, sin ningún aporte proteínico a diferencia de la miel cuyo aporte calórico es de 3 150 – 3 350 cal. por 1 Kg. de miel (16,18).

Existen pocos trabajos realizados sobre los efectos antibacterianos de la miel de abeja, entre los que resaltan los estudios hechos por Vardi, A. 1998. "Aplicación local de miel en el tratamiento de infecciones de heridas postoperatorias en neonatos" (19). *Acta Paediatr.* Este estudio se realizó con 9 neonatos que tenían herida postoperatoria infectada y no respondían al tratamiento convencional (Solución acuosa de clorexidina, ácido fusídico). Por el contrario todos los infantes

tratados con miel de abeja tópica (5-10mL), dos veces al día, mostraron marcada mejora clínica al 5to día de tratamiento, al 21avo día la herida fue curada completamente. No se presentó reacciones adversas al tratamiento. Otro estudio realizado por Schramm, D. 2003. "Las mieles con alto contenido de ácidos fenólicos pueden aumentar la capacidad reductora de antioxidantes en suero humano" (6). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; se compara la capacidad reductora de antioxidante en el plasma, analizando jarabe de maíz y miel de alforfón. En el grupo tratado con miel, el volumen plasmático fenólico total aumentó tanto como su capacidad antioxidante en plasma. Por el contrario, el jarabe de maíz no tenía efecto significativo. El estudio indica que los antioxidantes fenólicos de la miel procesada son biodisponibles, aumentando la actividad antioxidante en el plasma y las defensas del cuerpo contra las reacciones oxidativas. Engeseth, N. 2002; "Actividad antioxidante y Antimicrobiana de la miel contra patógenos orales" (20). El propósito de este estudio era caracterizar el contenido antioxidante de la miel de 10 fuentes florales diferentes (*la salvia, naranja, tupelo, manuka, alforfón, acacia, fireweed, trébol, Christmasberry Hawaiano, y soja*) y determina el efecto antibacteriano en patógenos orales (*Streptococcus mutans, Porphyromonas gingivalis, Actinobacillus actinomycetemcomitans, Fusobacterium nucleatum*). Los componentes antioxidantes específicos incluso el contenido fenólico y de ascorbato eran determinados mediante HPLC. La capacidad antioxidante de las mieles se debe principalmente a su contenido fenólico, más que al efecto enzimático y el ácido ascórbico.

La miel es un recurso natural sirve al hombre en forma diversificada; que no ha sido posible encontrar literatura especializada sobre la miel de abejas en diferentes aspectos sustantivos, lo que despertó nuestro interés sobre aspectos químicos de los constituyentes, así como su posible efecto antibacteriano que posee; nuestro interés se traduce en la siguiente interrogante: *¿La miel de abeja tiene efecto de antibiosis sobre microorganismos grampositivos y gramnegativos?*. Planteándose la hipótesis de que: La miel de abeja, por presentar elevada osmolaridad, naturaleza ácida, formación de peróxido de hidrógeno y metabolitos secundarios tiene efecto de antibiosis "in vitro" sobre microorganismos grampositivos y gramnegativos.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Recolección de la muestra:

Se recolectó: 500 g de miel de abeja obtenida del distrito de Shirac, provincia de San Marcos, departamento de Cajamarca; recolectada en el mes de Julio 2004 (M_A). 500 g de miel de abeja obtenida del distrito de Pampas de Hospital, provincia de Tumbes, departamento de Tumbes; recolectada en el mes de Junio del 2005 (M_B). Estas muestras se recolectaron en envases estériles, herméticamente cerrados, conservados a temperatura ambiente y protegidos de la luz

2. Identificación de metabolitos:

2.1. Metabolitos Primarios: Se hizo las pruebas para Azúcares Reductores (5,10,21).

Procedimiento: En un tubo de ensayo se colocó la muestra en estudio (M_A y M_B), se procedió a realizar las reacciones para análisis de azúcares reductores (Anexo I).

ENSAYOS DE IDENTIFICACION	METABOLITOS PRIMARIOS
Reacción de Bial	Pentosas
Reacción de Bertrand	Pentosas
Reacción de Berg	Aldosas
Reacción de Selivanoff	Cetosas
Reacción de Fehling	Azúcares Reductores

2.2. Metabolitos Secundarios: (21,22)

Método: Se realizó el ensayo químico siguiendo la "PRUEBA A LA GOTA". (Diseño 1).

ENSAYOS DE IDENTIFICACION	METABOLITOS SECUNDARIOS
Reacción de Espuma	Saponinas
Reacción de Gelatina	Taninos
Reacción de Cloruro férrico	Hidroxilos fenólicos en general
Reacción de Shinoda	Flavonoides
Reacción de Liebermann-Burchard	Esteroides
Reacción de Bornträger	Quinonas
Reacción de Rosenheim	Leuciantocianidinas
Reacción de Dragendorff	Alcaloides
Reacción de Mayer	Alcaloides

Procedimiento: Se pesó 1 g de muestra problema "A" y "B"; se agregó 5-10 ml de solvente, se sometió a reflujo controlado por 10 min. a Baño María, se dejó que enfriar para luego filtrar. Se procedió los ensayos según el extracto obtenido (Diseño 1):

2.2.1. Extracciones de los metabolitos secundarios.- Se realizó 4 tipos de extracciones (Anexo II):

- **Diclorometánica al 40%:** Compuestos de muy baja polaridad como: *esteroides, quinonas*.
- **Metanólica al 40%:** Compuestos de polaridad muy variada, como: *esteroides, alcaloides, flavonoides, taninos*.
- **Acuosa ácida 1%:** Compuestos básicos, como: *alcaloides*.

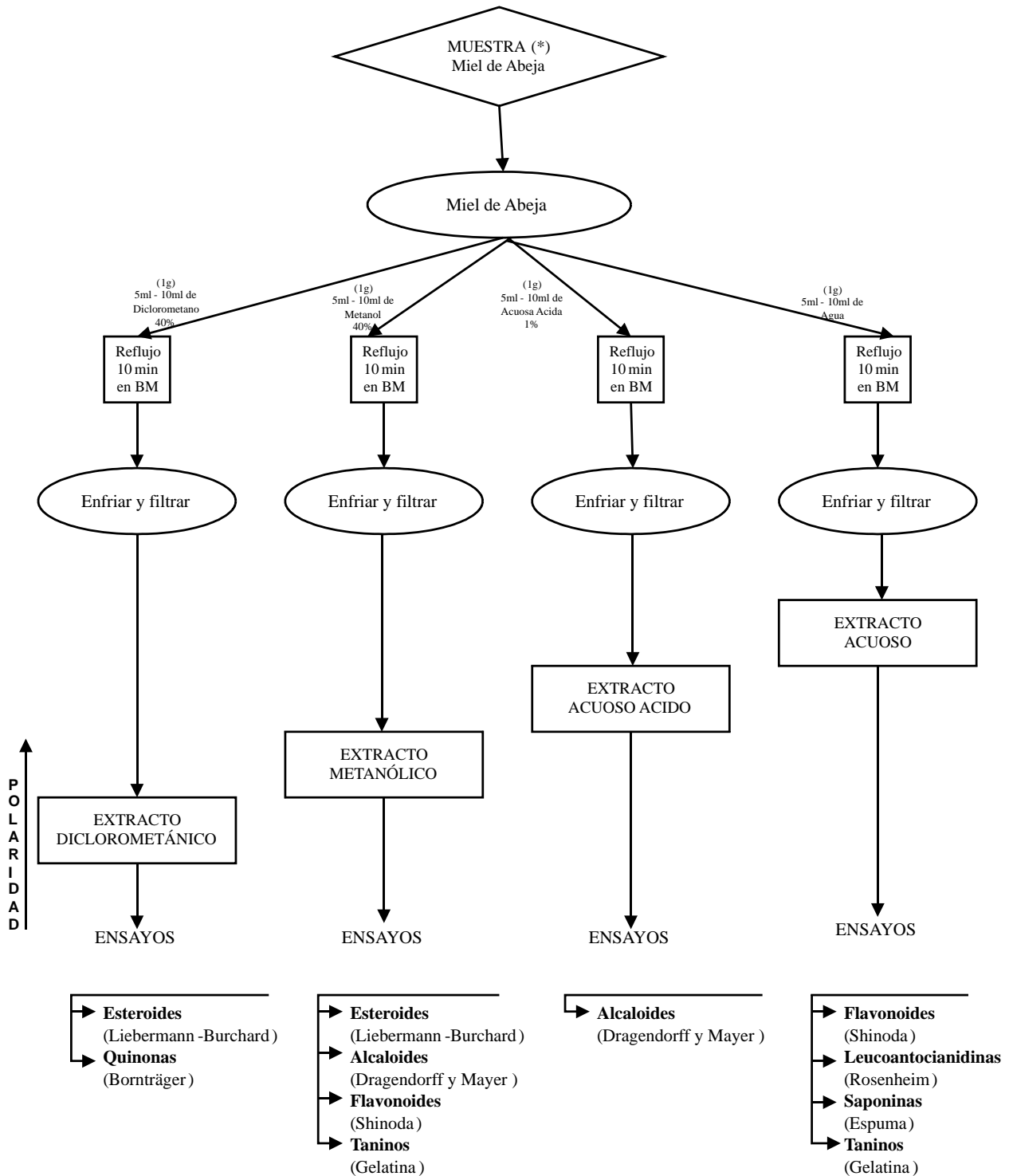
- **Acuosa:** Compuestos de alta polaridad: *flavonoides, saponinas, leucoantocianidinas, taninos*.⁽²⁵⁾

Procedimiento: Se pesó 4 g de la muestra en estudio. Luego se dividió el material en cuatro partes, con 1g cada una. Se agregó de 5 a 10 mL de solvente, a cada gramo (para extractos 1, 2, 3 ó 4) respectivamente (Anexo II). Se sometió a reflujo controlado por 10 min, en Baño María a cada extracto. Se dejó enfriar y posteriormente se filtró cada extracto por separado. Finalmente se realizó los ensayos correspondientes (Anexo III).

2.3. Lectura a los resultados: Los resultados se analizaron en el programa Microsoft Office Excel 2003, obteniéndose promedios representados en tablas y gráficos.

Diseño 1: CONTRASTACIÓN DEL ENSAYO QUÍMICO (22)

"Prueba a la gota"



Y OTRAS QUE SEAN NECESARIOS SEGÚN EL CASO

▲ Aumenta la polaridad
(*)

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

2.4. Ensayo microbiológico:

Se realizó por el Método de Difusión en Discos – Método de Kirby & Bauer. (15,23,24,26).

2.4.1. Tratamiento de la muestra: Se empleó 2 muestras de mieles de diferentes lugares de procedencia, las cuales estuvieron identificadas (M_A y M_B). Se sometió a los grupos control y problema en cada placa con el microorganismo seleccionado (DISEÑO 2).

2.4.2. Preparación del inóculo bacteriano:

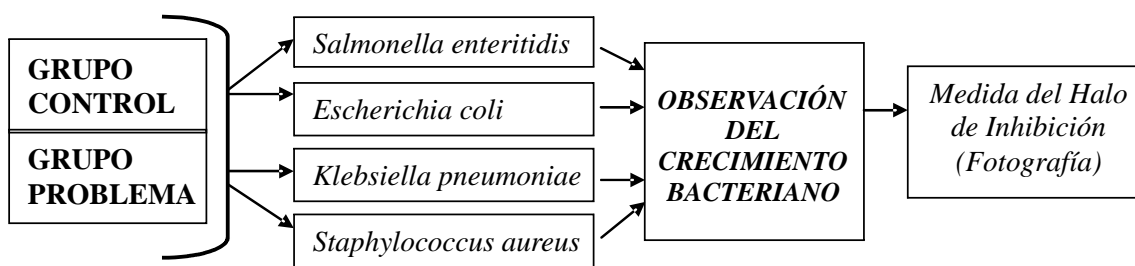
Se obtuvieron 4 cultivos puros de los siguientes microorganismos: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis* y *Klebsiella pneumoniae*. Todos ellos se incubaron a 37°C por 24h (25,27,28).

2.4.3. Preparación de medios de cultivo: (25)

De los cultivos previamente identificados se sembraron diariamente cada cepa patrón en medio de cultivo. El medio para las cepas de *S.aureus*, *E.coli*, *S.enteritidis*, *K.pneumoniae*; fue Agar nutritivo.

Se mezcló e hirvió por 15 minutos. Se esterilizó en autoclave a 121° x 15Lb. de presión durante 15 minutos. Se agregó en placas estándar de 91mm (20ml c/u) y viales (3ml c/u); y se obtuvo un grosor homogéneo de aproximadamente 4mm. Las placas se llevaron a 37° C en incubadora durante 30 a 60 minutos con la finalidad de eliminar la humedad de la superficie de la placa.

DISEÑO 2: Contratación del Efecto de Antibiosis “in vitro” de la miel de abeja



LEYENDA:

GRUPO CONTROL: Discos de Sensibilidad

GRUPO PROBLEMA: Se realizó el Ensayo con las M_A y M_B.

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

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

2.4.4. Prueba de antibiosis:

2.4.4.1. Preparación de los discos: Se obtuvo discos de 4mm. de diámetro de papel de filtro Whatman N° 2, se esterilizó en autoclave a 121 °C con 15Lb de presión durante 15 minutos, se conservó en frascos cerrados. Se empapó los discos en la miel de abeja y desecaron los discos preparados, manteniéndose asépticamente, usados luego en la Prueba de Antibiosis (29).

2.4.4.2. Inoculación de las placas: Se realizó la suspensión del microorganismo (incubado por 24h) en suero fisiológico. Se tomó 1ml de suspensión y se vertió en placas estériles (91mm. de diámetro); se

distribuyó en toda la placa. Se retiró el exceso de la suspensión. Se incubó por 2 h a 37 ° C. Se aplicó los discos de antibióticos alrededor y los discos de miel de abeja en el centro, equidistantes previamente marcados en la superficie de las placas incubadas. Se llevó a incubar a 37 °C por 24 horas (24,28).

2.4.5. Lectura a los resultados:

Control del efecto antimicrobiano: Mediante la medición con regla milimetrada de los diámetros de la zona de inhibición del crecimiento bacteriano, de cada disco de sensibilidad y para cada microorganismo. Mediante el Control Fotográfico.

RESULTADOS

En el cuadro N° 1 se observa la identificación de metabolitos primarios según la técnica de identificación, en el cuadro N° 2 se observan los extractos empleados, en el cuadro N° 3 se observa la intensidad del color y/o precipitado en la muestra A y en el cuadro N° 4 de la muestra B. En el cuadro

N° 5 las medidas de los halos de la inhibición bacteriana en muestras de miel de abeja. En los gráficos N° 5, 6 y 7 se muestran fotografías de los halos de inhibición de los diferentes grampositivos y gramnegativos tratados.

Cuadro N° 1: Identificación de metabolitos primarios en muestras de miel de abeja.

Técnica de Identificación	METABOLITOS PRIMARIOS	Miel de Abeja	
		M _A	M _B
<i>Reacción de Fehling</i>	<i>Azúcares Reductores</i>	++	+
<i>Reacción de Bial</i>	<i>Pentosas</i>	++	+
<i>Reacción de Bertrand</i>	<i>Pentosas</i>	++	+
<i>Reacción de Selivanoff</i>	<i>Cetosas</i>	++	+
<i>Reacción de Berg</i>	<i>Aldosas</i>	+	+

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

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

- : NEGATIVO

+ : POSITIVO (Presencia de metabolitos primarios)

++ : POSITIVO (Marcada presencia de metabolitos primarios)

Cuadro N° 2: Identificación de los metabolitos secundarios en muestras de miel de abeja.

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

LEYENDA: Presencia (+)

No Presencia (-)

Cuadro N° 3: Determinación de constituyentes de acuerdo a la intensidad de color y/o precipitado en la muestra "A"

ENSAYOS	CONSTITUYENTES	EXTRACTOS			
		Diclorometánico	Metanólico	Acuoso-Ácido	Acuoso
Espuma	Saponinas		Negativo		Negativo
Gelatina	Taninos		Negativo	Negativo	Negativo
Fe Cl ₃ 9%	Hidroxis fenólicos		Negativo		Negativo
Shinoda	Flavonoides		Positivo(+,+, +)		Positivo(+,+, +)
Liebermann-Burchard	Esteroides		Positivo(+,+, +)		
Borntrager	Quinonas	Negativo			
Rosenheim	Leucoantocianidinas	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo(+, +)
Dragendorff	Alcaloides		Negativo	Negativo	Negativo
Mayer	Alcaloides				Negativo

Constituyente: Positivo, si hay. Negativo, no hay.
 Intensidad del color y/o precipitado del constituyente existente:
 (-, +) = Ligera presencia de constituyentes químico
 (+, +) = Presencia de constituyentes químico
 (+, +, +) = Marcada presencia de constituyentes químicos

Cuadro N° 4: Determinación de constituyentes de acuerdo a la intensidad de color y/o precipitado en la muestra "B"

ENSAYOS	CONSTITUYENTES	EXTRACTOS			
		Diclorometánico	Metanólico	Acuoso-Ácido	Acuoso
Espuma	Saponinas		Negativo		Negativo
Gelatina	Taninos		Negativo	Negativo	Negativo
Fe Cl ₃ 9%	Hidroxis fenólicos		Negativo		Negativo
Shinoda	Flavonoides		Positivo(+, +)		Positivo(+, +)
Liebermann-Burchard	Esteroides	Negativo	Positivo(+, +)		
Borntrager	Quinonas	Negativo		Negativo	
Rosenheim	Leucoantocianidinas		Negativo	Negativo	
Dragendorff	Alcaloides		Negativo		Positivo(+, +)
Mayer	Alcaloides				Negativo

Constituyente: Positivo, hay. Negativo, no hay
 Intensidad del color y/o precipitado del constituyente existente:
 (-, +) = Ligera presencia de constituyente químico
 (+, +) = Presencia de constituyentes químicos
 (+, +, +) = Marcada presencia de constituyentes químicos

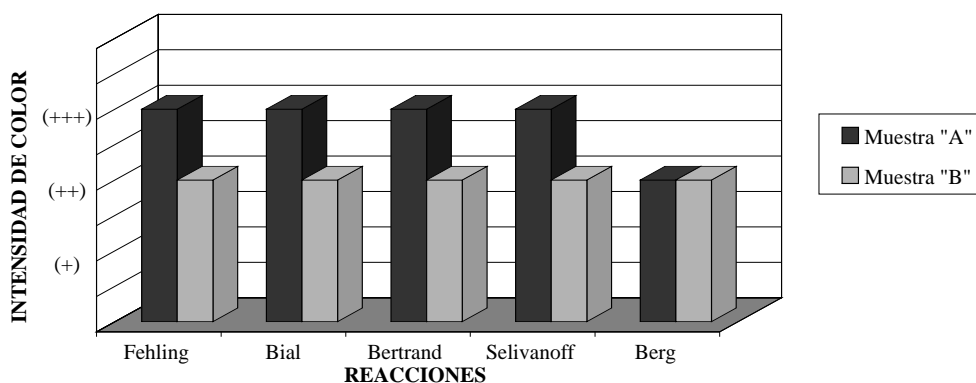


Gráfico N° 1: Reacción de identificación de metabolitos primarios de las muestras de miel de abeja.

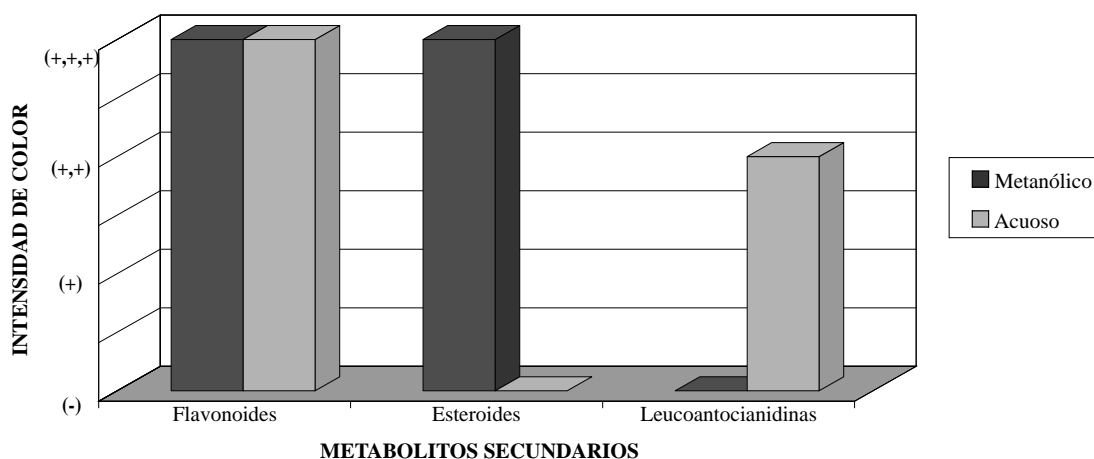


Gráfico N° 2: Determinación de constituyentes químicos de acuerdo a la intensidad de color y/o precipitado en la M_A.

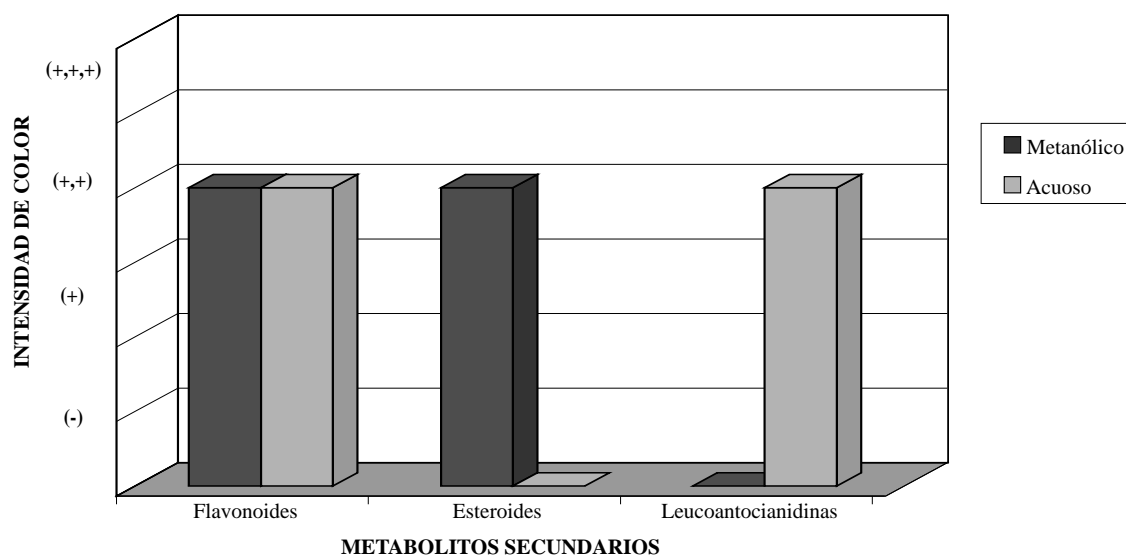


Gráfico N° 3: Determinación de constituyentes químicos de acuerdo a la intensidad de color y/o precipitado en la M_B.

Cuadro N° 5: Resultados de las medidas de los Halos de inhibición bacteriana producidas por exposición de las muestras de miel de abeja y los discos de sensibilidad frente a las cepas tratadas.

Discos de Sensibilidad	Conc.	Medidas de Diámetro de Halos de Inhibición (mm)			
		<i>Salmonella enteritidis.</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Ampicilina	10 µg	20	25	R	-
Lincomicina	2 µg	-	-	-	17.5
Amoxicilina	10 µg	-	-	-	30
Ac.Nalidíxico	30µg	10	12	R	-
Ciprofloxacino	5 µg	R	-	-	-
Amikacina	30 µg	-	50	-	-
SMX/TMP	25µg/5µg	-	-	-	19
Tetraciclina	30 µg	19	-	R	30
Ceftriaxona	30 µg	-	-	-	20
Trimetropim	5 µg	-	25	R	-
M _A	Cc.	52	40	R	15
M _B	Cc.	40	30	R	7

LEYENDA:
 R: Resistente
 (-): No tratado

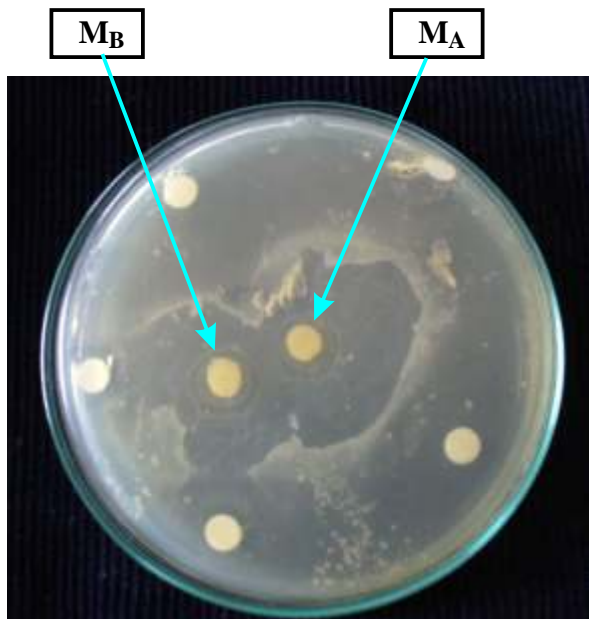


Gráfico N° 4: Diámetro de los halos de inhibición producidas por exposición de la miel de abeja y los discos de sensibilidad frente a *Salmonella enteritidis*

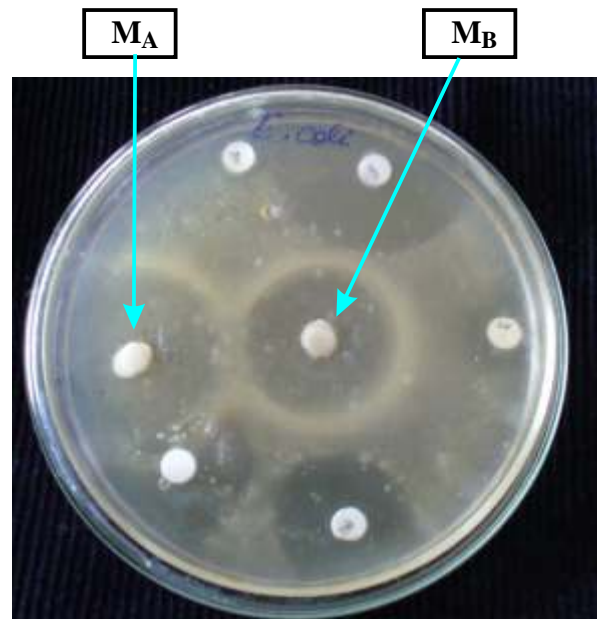


Gráfico N° 5: Diámetro de los halos de inhibición producidas por exposición de la miel de abeja y los discos de sensibilidad frente a *Escherichia coli*

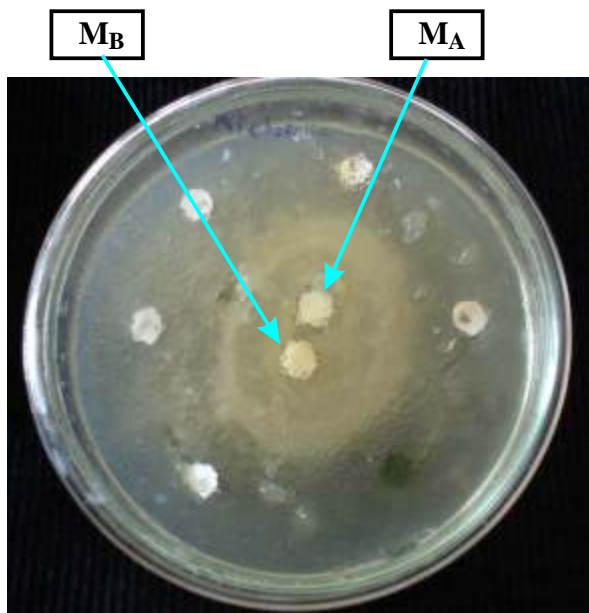


Gráfico N° 6: Diámetro de los halos de inhibición producidas por exposición de la miel de abeja y los discos de sensibilidad frente a *Klebsiella pneumoniae*.

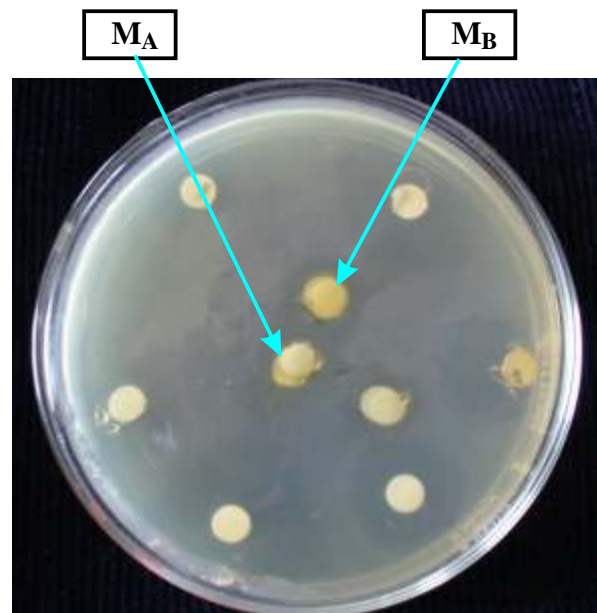


Gráfico N° 7: Diámetro de los halos de inhibición producidas por exposición de la miel de abeja y los discos de sensibilidad frente a *Staphylococcus aureus*.

DISCUSIÓN

Aunque en su contenido la miel varía según las flores de las que procede; su composición química está constituida por tres elementos esenciales; *azúcar, agua y sustancias minerales* (30).

En el *método de Olga Lock de Ugaz* se determinó que las dos muestras dieron resultados

positivos en la identificación de metabolitos primarios. Por los resultados obtenidos, la muestra “A”, presenta mayor cantidad de metabolitos primarios que la muestra “B”. La osmolaridad alta que presenta la miel como consecuencia de su elevada concentración de azúcares es en parte responsable de sus efectos de antibiosis por

mecanismos físicos como es la deshidratación de la célula bacteriana e inhibiendo la división celular (11,20,26,31).

En la identificación de metabolitos secundarios en ambas muestras se identificó esteroides, flavonoides, leucoantocianidinas. En la identificación de flavonoides, éste se encontró en extracto metanólico y acuoso, pero la muestra "A" presentó mayor cantidad de estos metabolitos que en la muestra "B", por mayor intensidad de color en la reacción. El espectro terapéutico de los flavonoides es notablemente amplio y se debe a su variabilidad estructural como antiinflamatorios debido a su capacidad para eliminar los radicales libres y a sus capacidades antioxidantes (17,32,33). Las abejas añaden además al néctar de las flores una enzima llamada glucosa oxidasa. Sucede que cuando la miel de abejas es aplicada sobre una herida esta enzima produce a nivel local una liberación lenta de peróxido de hidrógeno, responsable también de la actividad de antibiosis (26,33,34,35,36).

Su elevado contenido en azúcar, su osmolaridad, pH ácido son los factores que inhiben el crecimiento bacteriano, su pobre contenido en proteínas que privan del nitrógeno que necesitan las bacterias para crecer, hacen de la miel una barrera contra infecciones. Asimismo, debido a los antioxidantes, la miel es un excelente elixir para frenar la aparición de los radicales libres, responsables del envejecimiento y del padecimiento de algunas enfermedades (20,32).

En el Cuadro 5 se presentan los diámetros de los halos de inhibición para cada Bacteria Gram Positiva y Gram Negativa; los que nos permiten observar la actividad de las sustancias frente a dichas bacterias en estudio. Así tenemos que para *Escherichia coli* y *Salmonella enteritidis* la sensibilidad es muy buena, para *Staphylococcus aureus* es buena y para *Klebsiella pneumoniae* resulta insensible.

Del análisis realizado a los halos de inhibición de bacterias gram negativas, se obtiene que el mayor halo de inhibición para *Salmonella enteritidis* fue de 52mm para la muestra "A" y 40

mm para la muestra "B"; seguido del cultivo de *Escherichia coli* con 40mm y 30mm para las muestra "A" y muestra "B" correspondientemente. Infiriendo de esto que ambos gérmenes son sensibles a la miel de abeja los valores muestran que la miel de abeja tiene mayor acción inhibitoria en el crecimiento de *Salmonella enteritidis* que en el de *Escherichia coli*.

Del análisis realizado a los halos de inhibición de bacteria gram positiva, se obtiene que el halo de inhibición para *Staphylococcus aureus* fue de 15 mm para la muestra "A" y 7 mm para la muestra "B".

Al comparar los halos de inhibición obtenidos con los antibacterianos de uso convencional, en el caso de *Escherichia coli* resultó que las muestras de miel de abeja presentaron menor halo de inhibición que la Amikacina y mayor que Tetraciclina, Trimetropim, Ampicilina y Acido Nalidíxico; siendo además la M_A la que tuvo mayor halo de inhibición que la M_B. Los resultados para *Salmonella enteritidis* indican que con las M_A y M_B se presentaron mayor sensibilidad siendo los halos de inhibición de 52 mm y 40 mm, correspondientemente; ésta comparación es frente a Tetraciclina, Ampicilina y Acido Nalidíxico; esta bacteria resultó resistente a Ciprofloxacino. El *Staphylococcus aureus* presentó menores halos de inhibición a las M_A y M_B de miel de abeja (15mm y 7mm, correspondientemente) y frente a Sulfametoxazol/Trimetropim, Amoxicilina, Lincomicina, Tetraciclina y Ceftriaxona los halos de inhibición presentados fueron de 19mm, 30mm, 17.5mm, 18mm y 20mm. El cultivo de *Klebsiella pneumoniae* resultó insensible para las muestras de miel de abeja y para los antibióticos tales como: Trimetropim, Tetraciclina, Amikacina, Acido Nalidíxico.

Si bien en el presente trabajo se utilizó un número limitado de aislamientos, los resultados indican que la generación de cepas resistentes a antimicrobianos es un problema emergente en nuestro país, y presenta una importante dispersión geográfica. La situación actual hace primordial la necesidad de intensificar la investigación relacionada con estrategias alternativas para el control efectivo de las enfermedades (20,29).

CONCLUSIONES

El análisis de los resultados nos permite concluir en lo siguiente:

1. El estudio químico, siguiendo el ensayo químico

de la "Prueba a la gota", se encontraron los siguientes constituyentes: Esteroides, flavonoides, leucoantocianidinas.

2. La miel de abeja tiene efecto de antibiosis "in vitro" sobre cultivos bacterianos de *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus*.

3. La miel de abeja no tiene efecto de antibiosis "in vitro" sobre cultivos bacterianos de *Klebsiella pneumoniae*.

RECOMENDACIONES

Los estudios de productos biológicos en nuestro país, ofrecen un conocimiento amplio; por lo que nos permitimos sugerir que se debieran realizar investigaciones de aplicación desde el punto de vista químico, farmacológico y tecnológico; para ésto es necesario la cooperación de autoridades, mayor inversiones en investigaciones científicas.

Los constituyentes encontrados en el estudio químico son de interés farmacológico plasmándose en el Efecto de Antibiosis "in vitro" realizado que tuvo muy buenos resultados; se sugiere que posteriores estudios farmacológicos y/o bioquímicos se profundicen el presente trabajo de investigación realizándolo "in vivo".

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- IV Congreso nacional de apicultura 2004 Apicultura. Ponta Delgado – Brasil [En línea] (Consulta: 14 de Octubre 2005). Disponible en: <http://www.vidaapicola.com/sumarios/van128.html>.
- Burzi F. Apiterapia. Natudel. La Molina – Perú 2004 (En línea) (Consulta: 17 de Octubre 2005). Disponible en: <http://www.natudel.com>.
- Kirk R, Sawyer R, Egan H. Composición y Análisis de alimentos de Pearson 9na ed. Ed. Continental. México 2004. p. 236-241.
- Bellido SH. Perú, Riqueza y Diversidad Biológica. Rev. Acción Rural. Lima – Perú. 1989. p. 4-6
- Simon M. Informe de salud de la OMS. [En línea]. [Consulta: 15 de Diciembre 2005]. Disponible en: http://www.rnw.nl/informarn/html/act031219_oms.html
- Schramm D, Karim M, Schrader H, Holt R, Cardetti M, Keen C. Honey with high levels of antioxidants can provide protection to healthy human subjects. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2003;51(6):1732-1735.
- Guía Técnica. APICULTURA EN EL SALVADOR. El Salvador - San Salvador. 2004. [En línea] [Consulta: 28 de Noviembre]. Disponible en: www.agronegocios.gov.sv/comoproducir/guias/apicultura.pdf
- Fert G. Apis mellifera entre los Incas. Natural Delivery Peru. Huaraz – Perú. 2004. (En línea) (Consulta: 02 de Noviembre 2005). Disponible en: http://www.beekeeping.com/rfa/articles/incas_es.htm
- Inei. Plan regional de promoción y Formalización para la Competitividad y desarrollo de las MYPES. Consultorías-Diagnóstico PyMEs y Gremios Empresariales, Diagnóstico a Organizaciones Agrarias. Cajamarca-Perú. 2004
- Código Alimentario Argentino -Res.GMC 15 / 94 Dirección de Industria Alimentaria Reglamento Técnico MercoSur de Identidad y Calidad de Miel. Buenos Aires – Argentina. 1989 [En línea] (Consulta: 14 de Octubre 2005). Disponible en: http://www.alimentosargentinos.gov.ar/0-3/apicola/4_legal/a_CAA/Caa_GMC_1594.htm
- Bogdanov S. Antibacterial substances in honey Swiss Bee. Suiza. 1997. (En línea) (Consulta: 17 de Octubre 2005). Disponible en: http://www.apis.admin.ch/en/bienenprodukte/docs/honig/antibacterial_e.pdf
- Roman D. Las Abejas y la Miel. Vegan Society británica. Madrid – España. 2003. [En línea] [Consulta: 25 de Noviembre 2005] <<http://www.ivu.org/ave/abejas.html>>
- Expo ciencia. Abeja y sus productos: Organización de la colmena. Conducta social. Polinización. Apicultura. 2002. [En línea] (Consulta: 18 de Noviembre 2005). Disponible en: <http://www.abeja-y-sus-productos.html>
- Smith L, Campbell F, Seers K, Mcquay H. Systematic review of the use of honey as a wound dressing. Complementary and Alternative Medicine. EEUU. 2001. [En línea] [Consulta: 24 de Noviembre]. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=32305>
- Avallone C, Montenegro S. Alteraciones fisicoquímicas de los principales parámetros de la miel cuando es utilizada como materia prima de alimentos. Universidad Nacional del Nordeste, Facultad Agroindustrias. Bs As – Argentina. 2004 (Consulta: 25 Octubre 2005). Disponible en: http://www.beekeeping.com/articulos/trabajo_cyt.doc
- Quero A. Las Abejas y la Apicultura Departamento de Biología de Organismos y Sistemas – Universidad de Oviedo. Oviedo – España. 2004. [En línea] [Consulta: 28 de Noviembre]. Disponible en: <http://www.uniovi.es/BOS/Cursos/Verano/Lasabejasyapicultura/abejas.htm>
- Thrasivoul U. La Relación entre las características Físico-Químicas de la miel y los parámetros de sensibilidad a la cristalización Apiacta, 2001, 36 (2), 106 – 112
- Scientific Report Office Of Complementary Medicines. Honey. EEUU. 1998. [En línea] [Consulta: 24 de Noviembre] Disponible en: <http://www.tga.gov.au/docs/pdf/cmec/honeysr.pdf>
- Vardi A, Barzilay Z, Linder N, Barzilai A. Local application of honey for treatment of neonatal postoperative wound infection, Acta Paediatr. 1998 Apr; 87(4):429-32.
- Gheldof N, Engeseth N, Wang X, Nickelsen J, Wu C. Antioxidant and Antimicrobial Activity of Honeys Against Oral Pathogens Journal of Dental. 2002; Journal of Dental Research. 2002;80:349.
- Boncun B, De Los Rios E, Ruiz G. Guía de Prácticas de Farmacognosia II. Ed. Multicopias S.A. Trujillo - Perú. Pág. 55-59. 2004.
- Lock De Ugaz O. Investigación Fitoquímica. Métodos de Estudio de Productos Vegetales. 2da ed. Ed. Pontificia Universidad Católica del Perú. 1988. p. 1-8.
- Andargarchew M, Belay T, Feten D. In vitro assessment of the antimicrobial potential of honey on common human pathogens. Gondar University College Ethiopia. Gondar – Etiopía 2004. [En línea] [Consulta: 30 de Setiembre 2005]. Disponible en: <http://www.cih.uib.no/journals/EJHD/ejhdv18-no2/7in%20vitro.pdf>.
- Cabrera L, Ojeda G, Céspedes E. Actividad Antibacteriana

- De Miel De Abejas Multiflorales (*Apis Mellifera* Scutellata) de cuatro Zonas Apícolas del Estado Zulia, Venezuela. Facultad de Ciencias, Universidad del Zulia. Zulia – Venezuela. 2003. [En línea] (Consulta: 14 de Octubre 2005). Disponible en: http://216.239.51.104/search?q=cache:fPQRT_2MHzUJ:us.geocities.com/atiliojose/vet133-7.pdf+bactericida+%2B+miel+de+abeja+filetype:pdf
25. De La Cruz M, Calderón N. 1991. Obtención de propóleos de las colmenas de *Apis mellifera* y ensayo de su efecto antimicrobiano. Universidad Nacional de Trujillo. Perú. Pp. 11-13.
 26. Ghaderi R, Afshar M. Topical Application of Honey for Treatment of Skin Wound in Mice. 29(4). Birjand-Iran 2004. [En línea] (Consulta: 01 de Octubre 2005). Disponible en: http://www.sums.ac.ir/~ijms/29_4/08-Ghaderi.pdf
 27. Murray M. Microbiología Médica 2ª ed. Ed. Hacourt Brace. Madrid - España. 1997. p. 233-234
 28. Shadom Y, Lennete E, Balowf A, Haufler W. Microbiología Clínica. 4ta ed.: Médica Panamericana. Buenos Aires – Argentina. 1987. p. 1230-1235.
 29. Fierro W. Evidencia Científica del propóleos desde el punto de vista médico. Buenos Aires – Argentina. 2004.. [En línea] (Consulta: 18 de Noviembre 2005). Disponible en: <http://www.apinetla.com.ar/congreso/c03.pdf>.
 30. Assef J, De Avila A. El uso de la miel y el romerillo en el tratamiento de Estomatitis subprotésica. Facultad de Ciencias Médicas. Cuba. 2004.
 31. Badaway O, Shafii S, Tharwat E, Kamal A. Antibacterial activity of bee honey and its therapeutic usefulness against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* infection. *Epiz – Egipto. Rev. 1012 . sci. tech.* 2004. Off. int. *Epiz.*, 23 (3) Egypt (En línea) (Consulta: 03 Noviembre 2005). Disponible en: <http://www.oie.int/eng/publicat/rt/2303/pdf/29-badawy1011-1022.pdf>
 32. Andrades P, Sepulveda S, Gonzalez E. Curación avanzada de heridas. *Rev. Chilena de Cirugía.* 2004. 56(4): [En línea] [Consulta: 30 de Setiembre 2005]. Disponible en: [http://www.cirujanosdechile.cl/Revista/PDF%20Cirujanos%202004_04/Rev.Cir.4.04.\(18\).AV.pdf](http://www.cirujanosdechile.cl/Revista/PDF%20Cirujanos%202004_04/Rev.Cir.4.04.(18).AV.pdf)
 33. Resurreccion A, D`Arcy B. Summary of a research project funded by the National Honey Board. University of Georgia-Griffin. Antioxidants in Australian Floral Honeys – Identification of health-enhancing nutrient components” Australia. 2005. [En línea] [Consulta: 23 de Noviembre 2005]. <http://www.rirdc.gov.au/reports/HBE/05-040sum.html>
 34. González J, Rodríguez R, Machado, M. Heridas. Métodos de tratamiento [En línea]. MEDISAN 2004 [Consulta: 23 de Noviembre]. Disponible en: http://bvs.sld.cu/revistas/san/vol8_1_04/san07104.htm.
 35. Miraglio A. Honey–Health and Therapeutic Qualities. National Honey Board. EEUU. 2001. [En línea] [Consulta: 23 de Noviembre]. Disponible en: <http://itotd.com/articles/218/>.
 36. Silva J, Gonzales G, Jara R, Gavidia J. Guía de Prácticas. Bromatología Universidad Nacional de Trujillo. Facultad de Farmacia y Bioquímica. Trujillo – Perú. 2003. p. 121-123.

ANEXO I

EXTRACCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS PRIMARIOS

1. **Reacción de Bial:** Se calentó en un tubo de ensayo hasta ebullición 2ml del reactivo, se agregó I a II gotas de muestra, calentando. **En presencia de pentosas dio color verde. Las hexosas no dieron coloración.**
2. **Reacción de Bertrand:** Se colocó en un tubo de ensayo 2ml del reactivo y se agregó gotas de muestra. Se calentó con cuidado para evitar disociación molecular. **En presencia de pentosas dará coloración violeta. Las hexosas en iguales condiciones darán coloración roja o no reaccionan.**
3. **Reacción de Berg:** Se colocó en un tubo de ensayo 2ml de muestra y 1ml de agua de bromo. Se calentó en Baño María hasta eliminación total del bromo (Líquido incoloro e inodoro). Se añadió gotas del Reactivo de Berg. **En presencia de aldosas dio coloración amarilla**
4. **Reacción de Selivanoff:** Se calentó a ebullición en un tubo de ensayo 2ml de la muestra problema y 1ml de S.R. de Selivanoff. **En presencia de cetosas dio coloración roja.**
5. **Reacción de Fehling:** Se colocó en un tubo de ensayo 2ml de solución “A” y 2ml de solución “B” de Licor de Fehling, se llevó a ebullición y se añadió I gota de la muestra problema. **En presencia de azúcares reductores se observó la formación de un precipitado de color verde y finalmente rojo ladrillo**

ANEXO II

EXTRACCIONES DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS

Se realizó 4 tipos de extracciones:

- **Diclorometánica al 40%:** Compuestos de muy baja polaridad como: *esteroides, quinonas.*
- **Metanólica al 40%:** Compuestos de polaridad muy variada, como: *esteroides, alcaloides, flavonoides, taninos.*
- **Acuosa ácida 1%:** Compuestos básicos, como: *alcaloides.*
- **Acuosa:** Compuestos de alta polaridad: *flavonoides, saponinas, leucoantocianidinas, taninos.* (25)

CONSIDERACIÓN PRELIMINAR PARA REALIZAR LOS ENSAYOS EN LA SOLUCIÓN:

Diclorometánica:*Liebermann-Burchard*

: Se realizó la reacción de identificación.

Borntranger

: Se llevó a sequedad y redisolvió en tolueno. Se realizó la reacción de identificación.

Metanólica:*Liebermann-Burchard*

: Se llevó a sequedad y redisolvió en diclorometano. Se realizó la reacción de identificación. (25)

Shinoda

: Se realizó la reacción de identificación.

Gelatina

: Se llevó a sequedad y redisolvió en agua.

Se realizó la reacción de identificación.

Dragendorff

: Se llevó a sequedad y redisolvió en HCl 1%; luego se realizó la reacción de identificación.

Mayer

: Se llevó a sequedad y redisolvió en HCl

1%; luego se realizó la reacción de identificación.

H⁺/H₂O:*Dragendorff*

: Se realizó la reacción de identificación.

Mayer

: Se realizó la reacción de identificación.

H₂O:*Shinoda*

: Se llevó a sequedad y redisolvió en MeOH; luego se realizó la reacción de identificación.

Rosenhein

: Se llevó a sequedad y se realizó la reacción de identificación.

Espuma

: Se realizó la reacción de identificación.

Gelatina

: Se realizó la reacción de identificación (25).

ANEXO III**IDENTIFICACIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS****5.1. Cloruro férrico:**

- Se tomó 5 gotas de muestra problema y se añadió 1 gota de solución férrica. La coloración azul o verde, indica la presencia de OH fenólicos.

5.2. Gelatina:

- Se tomó 5 gotas de muestra problema y se añadió 1 gota de solución de gelatina. El precipitado blanco, indica la presencia de taninos.

5.3. Prueba de la espuma:

- Se colocó 1 ml de la muestra problema en un tubo de ensayo y se llevó a 5 ml con agua destilada. Se agitó vigorosamente por 30 segundos y se esperó 15 minutos. La persistencia de la espuma indica la presencia de saponinas.

5.4. Shinoda:

- Se tomó 10 gotas de la muestra problema, se agregó unos trocitos de magnesio metálico y 2 gotas de HCl concentrado. La coloración rojiza indica la presencia de flavonoides.

5.5. Liebermann-Burchard:

- Se tomó 10 gotas del extracto de muestra (disuelta en diclorometano), se añadió 10 gotas de anhídrido acético y luego 1 gota de ácido sulfúrico concentrado. Cambia la coloración en el transcurso de los primeros 30 minutos.

5.6. Bornträger:

- Se tomó 5 gotas del extracto de la muestra y se llevó a sequedad. Se agregó 0,5-1.0 ml de tolueno; luego 1 ml de NaOH al 5%.
- La coloración roja, en la fase acuosa, indica la presencia de antraquinonas y naftoquinonas

5.7. Rosenhein:

- Se tomó 5 gotas del extracto de muestra y se llevó a sequedad. Se agregó 0,5-1.0 mL de HCl 2N/1-propanol. Luego se hirvió de 15-30 minutos. La coloración roja indica la presencia de leucoantocianidinas.

5.8. Dragendorff:

- Se tomó 5 gotas del extracto de muestra (disuelta en HCl 1%), se agregó 2-3 gotas del reactivo. Aparece un precipitado rojo a naranja.

5.9. Mayer:

- Se tomó 5 gotas del extracto de muestra (disuelta en HCl 1%) y se agregó 3-4 gotas del reactivo. Aparece un precipitado blanco (25).