



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE MIELES PRODUCIDAS POR ABEJAS DEL  
GÉNERO *SCAPTOTRIGONA MEXICANA* EN CUETZALAN, PUEBLA

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

**PRESENTA**

ALEJANDRA CAMBRAY GALINDO



Ciudad Universitaria, CDMX

2020



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE: GLORIA DÍAZ RUIZ**

**VOCAL: BLANCA ESTELA RIVERO CRUZ**

**SECRETARIO: MABEL CLARA FRAGOSO SERRANO**

**1er. SUPLENTE: MARIO ALBERTO FIGUEROA SALDIVAR**

**2° SUPLENTE: BERENICE OVALLE MAGALLANES**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**LABORATORIO 111, DEPARTAMENTO DE FARMACIA, CONJUNTO E,  
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.**

**ASESOR DEL TEMA:**

**BLANCA ESTELA RIVERO CRUZ**

**SUSTENTANTE (S):**

**ALEJANDRA CAMBRAY GALINDO**

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme realizar el estudio de licenciatura en Química Farmacéutica Bióloga.

Al Dr. José Fausto Rivero Cruz por su apoyo, tiempo, dedicación y asesoría brindada para la realización de este proyecto.

A la Dra. Blanca Estela Rivero Cruz por su apoyo y asesoría brindada para la realización de este proyecto.

A la Dra. Gloria Díaz Ruíz por su tiempo y apoyo para proporcionar las cepas bacterianas y por la ayuda en la revisión de este trabajo.

A la Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano por su tiempo y asesoría brindada para la realización de este proyecto.

## ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	i
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. ANTECEDENTES.....	2
2.1 MORFOLOGÍA DE LAS ABEJAS Y ORGANIZACIÓN DE LAS COLONIAS .....	2
2.2 ABEJAS SIN AGUIJÓN .....	5
2.3 SCAPTOTRIGONA MEXICANA EN CUETZALAN, PUEBLA Y SU CULTIVO .....	7
2.4 IMPORTANCIA DE LAS ABEJAS SIN AGUIJÓN .....	8
2.5 LA MIEL Y SU COMPOSICIÓN.....	9
2.6 HISTORIA DE LA MIEL.....	11
2.7 EFECTOS TERAPÉUTICOS DE LA MIEL .....	12
2.8 PROBLEMÁTICA DE BACTERIAS RESISTENTES.....	14
2.9 AGENTES ETIOLÓGICOS DE GRAN INTERÉS .....	16
2.9.1 <i>Escherichia coli</i> .....	16
2.9.1.1 <i>Escherichia coli</i> enteropatógena.....	17
2.9.2 <i>Salmonella Typhimurium</i> .....	17
2.9.3 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	18
2.9.4 <i>Streptococcus mutans</i> .....	20
2.9.5 <i>Streptococcus pyogenes</i> .....	21
3. OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN.....	23
3.1 Objetivo general .....	23
3.2 Objetivos particulares.....	23
3.3 Justificación .....	24
4. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	25
4.1 Recolección de muestras .....	25
4.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria .....	26
4.3 Determinación de la concentración mínima bactericida .....	27

4.4 Determinación de la actividad de las mieles de <i>Scaptotrigona mexicana</i> sobre el crecimiento bacteriano .....	27
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	29
5.1 Determinación de la concentración mínima inhibitoria sobre los agentes etiológicos de interés .....	29
5.2 Determinación de la concentración mínima bactericida sobre los agentes etiológicos de interés .....	33
5.3 Determinación de la actividad de las mieles de <i>Scaptotrigona mexicana</i> sobre el crecimiento bacteriano .....	36
6. CONCLUSIONES .....	47
7. PERSPECTIVAS .....	48
8. BIBLIOGRAFÍA .....	49

#### ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Abejas <i>Scaptotrigona mexicana</i> en la colmena (M. en C. Jorge Jiménez).....	4
Figura 2. Cultivo de abejas <i>Scaptotrigona mexicana</i> en ollas de barro (M. en C. Jorge Jiménez) .....	7
Figura 3. Miel de la abeja <i>Scaptotrigona mexicana</i> (M. en C. Jorge Jiménez).....	11

#### ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Resultados de la Concentración Mínima Inhibitoria % (p/v) de las diez mieles probadas y controles sobre bacterias Gram negativas y Gram positivas. ....	32
Cuadro 2. Resultados de la Concentración Mínima Bactericida % (p/v) de las diez mieles probadas y controles sobre bacterias Gram negativas y Gram positivas. ....	35

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Inhibición de la bacteria <i>Staphylococcus aureus</i> frente a la miel 2 a diferentes concentraciones. ....	37
Gráfica 2. Inhibición de la bacteria <i>Staphylococcus aureus</i> frente a la miel 3 a diferentes concentraciones. ....	38
Gráfica 3. Inhibición de la bacteria <i>Staphylococcus aureus</i> frente a la miel 4 a diferentes concentraciones. ....	38
Gráfica 4. Inhibición de la bacteria <i>Staphylococcus aureus</i> frente a la miel 5 a diferentes concentraciones. ....	39
Gráfica 5. Inhibición de la bacteria <i>Staphylococcus aureus</i> frente a la miel 6 a diferentes concentraciones. ....	39
Gráfica 6. Inhibición de la bacteria <i>Streptococcus mutans</i> frente a la miel 2 a diferentes concentraciones. ....	41
41	
Gráfica 7. Inhibición de la bacteria <i>Streptococcus mutans</i> frente a la miel 4 a diferentes concentraciones. ....	42
Gráfica 8. Inhibición de la bacteria <i>Streptococcus mutans</i> frente a la miel 5 a diferentes concentraciones. ....	42
Gráfica 9. Inhibición de la bacteria <i>Streptococcus mutans</i> frente a la miel 6 a diferentes concentraciones. ....	43
Gráfica 10. Inhibición de la bacteria <i>Streptococcus mutans</i> frente a la miel 7 a diferentes concentraciones. ....	43
Gráfica 11. Inhibición de la bacteria <i>Streptococcus pyogenes</i> frente a la miel 2 a diferentes concentraciones. ....	45
Gráfica 12. Inhibición de la bacteria <i>Streptococcus pyogenes</i> frente a la miel 3 a diferentes concentraciones. ....	46
Gráfica 13. Inhibición de la bacteria <i>Streptococcus pyogenes</i> frente a la miel 4 a diferentes concentraciones. ....	46

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ABREVIATURAS</b>	<b>TERMINOLOGÍA</b>
a. C.	Antes de Cristo
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMB	Concentración Mínima Bactericida
CMI	Concentración mínima inhibitoria
d.C.	Después de Cristo
EAggEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatógena
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica
Spp	Especies
ROS	Especies reactivas de oxígeno
Etc.	Etcétera
XDR	Extremadamente resistentes
EAF	Factor de adherencia de EPEC
°C	Grados Celsius
BHI	Infusión Cerebro Corazón
µg/kg	Microgramo/kilogramo
µL	Microlitros
µm	Micrómetro
Mm	Milímetro
MDR	Multidrogosresistentes
OMS	Organización Mundial de la Salud
ORAs	Organismos resistentes a los antibióticos
%	Porcentaje
pH	Potencial de Hidrógeno
%p/v	Porcentaje peso volumen
GLASS	Sistema Mundial de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos de la Organización
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a la meticilina
UFC/mL	Unidad formadora de colonias/mililitro

## 1. INTRODUCCIÓN

La miel es la sustancia natural dulce producida por diferentes subespecies de abejas, a partir del néctar de las flores y de otras secreciones extra florales que las abejas extraen, transportan, transforman, combinan con otras sustancias, deshidratan, concentran y almacenan en panales [1].

En Puebla, en la Sierra Norte y en el Totonacapan, se mantiene y fortalece en la actualidad el cultivo de *Scaptotrigona mexicana* en ollas de barro. La Organización de Cooperativas Indígenas Tosepan Titataniske logró la declaración del municipio de Cuetzalan del Progreso como Santuario de las Abejas *Pisilnekmej* (*Scaptotrigona mexicana*), así como la de Baluarte de la miel virgen ante la organización Slow Food [2].

Hoy en día se sabe que la miel tiene efectos terapéuticos contra diversas enfermedades, también se le atribuye un efecto antibacteriano, este efecto se debe principalmente a las inhibinas. Estas consisten en peróxido de hidrógeno, flavonoides y ácidos fenólicos, además de otras sustancias sin identificar, aunque otros investigadores atribuyen la capacidad antibacteriana de la miel a la combinación de propiedades tales como su alta osmolaridad y bajo pH [1].

La miel es una excelente opción para tratar algunas enfermedades bacterianas y fúngicas por su efecto antimicrobiano, previniendo algunas enfermedades, cicatrizando heridas y por ende evitando infecciones, entre otros efectos terapéuticos. La miel natural puede ser un buen sustituyente de algunos antibióticos y así poder evitar la resistencia bacteriana.

Por las razones previamente mencionadas, este proyecto tiene como meta primordial determinar la actividad antimicrobiana de mieles recolectadas en distintos meliponarios elaborada por la abeja *Scaptotrigona mexicana* en Cuetzalan, Puebla. Utilizando diversas bacterias como modelos ya que son agentes etiológicos de diferentes enfermedades.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1 MORFOLOGÍA DE LAS ABEJAS Y ORGANIZACIÓN DE LAS COLONIAS**

Las características más notables de una abeja son: un cuerpo robusto, pelos plumosos, dos pares de alas (Figura 1), partes bucales succionadoras, diseñadas para recolectar el néctar de las flores y estructuras especializadas para el acarreo de polen [3].

Actualmente se piensa que las abejas son insectos que viven en colonias (abejas sociales); sin embargo, en realidad el 95% de las abejas viven solas (abejas solitarias) y sólo el 5% son sociales. Las hembras de las abejas solitarias construyen sus propios nidos sin la cooperación de otras hembras. Sus nidos son normalmente pequeños, con pocas celdas para cría y no almacenan miel. Cada madre realiza todas las actividades relacionadas con su nido: construcción y mantenimiento, poner huevos y proveer alimento a la cría. La vida de ella y del nido es corta, dura de semanas a pocos meses [2].

Entre las abejas sociales destacan dos grupos: las que son primitivamente sociales (como los abejorros) y las altamente sociales, como las abejas melíferas (género *Apis*) y las abejas sin aguijón. Sólo este último grupo (las que son altamente sociales) forma colonias permanentes (Figura 1) en donde almacenan miel y polen en grandes

cantidades. En sus colonias podemos encontrar grupos de individuos que cumplen una función especializada (y a cada grupo se le ha llamado “casta”) como la reina, muchas hembras trabajadoras (obreras) y unos pocos machos o zánganos [3].

La reina y las obreras dependen unas de las otras: la reina no sobrevive sin que las obreras la alimenten y las obreras no pueden formar por sí mismas una colonia viable sin el trabajo de la reina debido a que ellas no se pueden aparear y, por lo tanto, no pueden producir cría obrera [2], [4].

Casi todas las abejas son vegetarianas, consumen polen y néctar de las plantas. Además de ser una fuente importante de proteínas, el polen contiene carbohidratos, enzimas, vitaminas y minerales. Como este alimento es muy importante para las abejas, ellas han desarrollado diferentes adaptaciones físicas para recolectarlo. El néctar es la principal fuente de carbohidratos, es decir, de energía, en la dieta de las abejas. En su estómago, las abejas sociales transforman el néctar en miel la cual almacenan en las celdas o potes dentro del nido. Las abejas emplean la miel almacenada cuando hay escasez de alimentos, es decir, en la temporada de poca floración [4]. Todas las abejas necesitan agua, en especial las que viven en colonias (abejas sociales). El agua se emplea como alimento y para regular la temperatura de la colmena [2], [5].

Todas las abejas tienen pelos plumosos, algunas especies tienen más y otras presentan menos, de manera que casi no se ven. Al visitar una flor, el polen se queda pegado en estos pelos, lo que facilita a las abejas la recolección del polen [2].

Aparte de los pelos existen otras estructuras específicas para la recolección del polen: la escopa y la corbícula. La escopa consiste en una zona velluda ubicada en las patas

posteriores o en la parte ventral del abdomen. La corbícula o canasta de polen es una concavidad pulida en la pata posterior, rodeada de pelos [2].

La escopa y la corbícula tienen la misma función, pero esta última es más especializada y sólo algunos grupos de abejas la han desarrollado, como las abejas melíferas, los abejorros, las abejas de las orquídeas y las abejas sin aguijón. Algunas especies, que carecen de escopa o corbícula, transportan polen en el buche melario que es el estómago de las abejas [2].



**Figura 1.** Abejas *Scaptotrigona mexicana* en la colmena (M. en C. Jorge Jiménez).

## **2.2 ABEJAS SIN AGUIJÓN**

Las abejas sin aguijón son llamadas meliponinos o meliponini. En el continente americano, las abejas sin aguijón se distribuyen desde México hasta Argentina. En este continente existe la mayor diversidad de meliponinos, con más de 400 especies descritas, mientras que en la región indo-australiana se reportan cerca de 90 especies y en África casi 30 especies [2], [6].

En América (y por lo tanto en México) las únicas abejas sociales nativas que nos pueden proporcionar miel son las abejas sin aguijón. La abeja melífera y su variedad africana, de las cuales generalmente tomamos su miel, son originarias de Europa, África y Asia, y fueron introducidas al continente americano [2].

Las abejas sin aguijón viven en colonias que varían desde algunos centenares de individuos hasta más de 100,000 obreras dependiendo de la especie [4]. Estas colonias, son altamente sociales. Esto significa que viven en colonias permanentes y tienen tres grupos de individuos (reinas, obreras y machos) bien diferenciados, tanto morfológicamente como en cuanto a su comportamiento y tareas [2], [4].

Las abejas sin aguijón tienen una reina fecundada y tienen varias reinas vírgenes. El número de éstas varía de especie a especie. Especialmente la reina fecundada es más grande que el resto de los individuos, lo que se nota principalmente en su abdomen voluminoso. Ella es la única abeja en la colonia que puede poner huevos fertilizados, los cuales dan origen a hembras (obreras) y huevos no fertilizados que dan origen a machos (zánganos). Para que un huevo se convierta en una abeja reina, las larvas de las abejas sin aguijón reciben una cantidad mayor de alimento en comparación con las larvas que se conviertan en obreras o zángano [7]. En ocasiones, también las obreras pueden poner huevos, pero de éstos sólo saldrán zánganos

debido a que una obrera no se aparee con un macho, así que estos huevos no serán fertilizados [2].

Las obreras son las encargadas del mantenimiento de la colonia y tienen tareas como: forrajeo, limpieza, defensa del nido y alimentación de las larvas. Los zánganos tienen la función principal de aparearse con las reinas para formar otras colonias, en ocasiones también ayudan en la regulación de la colmena [2], [8].

La formación de nidos sirve a las abejas sin aguijón para albergar a su cría, para protegerse de los enemigos y del clima (lluvia, viento, calor y frío) y para almacenar el alimento que recogen de las plantas [2].

El nido está constituido por las siguientes partes: la entrada (con o sin piquera). El batumen que es una capa de material endurecida, negra o parda, que rodea el nido sirve para sellar grietas, delimitar y fijar el nido en la cavidad del árbol y ayuda a mantener estable la temperatura dentro del nido. El involucro que está constituido por una serie de láminas que envuelven a la cámara de cría. Su función principal es proteger a la cría y a la reina de enemigos, de cambios de temperatura y humedad. Los panales de cría que están dispuestos uno sobre otro y separados por pequeños pilares para que las abejas se desplacen entre ellos. Las celdas son utilizadas una sola vez, cuando la nueva abeja emerge, la celda es destruida y el material es reciclado dentro de la colmena y los potes o cántaros en donde se almacenan la miel y el polen [2].

### 2.3 SCAPTOTRIGONA MEXICANA EN CUETZALAN, PUEBLA Y SU CULTIVO

La abeja *Scaptotrigona mexicana* es una abeja sin aguijón que huele a coco y tiene un tamaño de 5.0 - 5.3 mm, es una abeja totalmente negra, a veces con alas anaranjadas. En cuanto a su conducta puede llegar a ser agresiva para defenderse y defender el nido mordiendo y enredándose en el cabello. Tiene un olor particular que atrae a más individuos en tiempos de defensa. Son abejas resistentes, con un número mayor de individuos en las colmenas en comparación con otras especies [2].

En Puebla, en la Sierra Norte y en el Totonacapan, se mantiene y fortalece en la actualidad el cultivo de *Scaptotrigona mexicana* en ollas de barro (Figura 2). La Organización de Cooperativas Indígenas Tosepan Titataniske logró la declaración del municipio de Cuetzalan del Progreso como Santuario de las Abejas Pisilnekmej (*Scaptotrigona mexicana*), así como la de Baluarte de la miel virgen ante la organización Slow Food [2].

Hasta ahora, el cultivo de abejas sin aguijón en ollas es conocido principalmente para la abeja *Scaptotrigona mexicana* en la Sierra Norte de Puebla, la cual se trabaja actualmente con dos ollas de barro unidas por la boca llamadas mancuernas [2].



**Figura 2.** Cultivo de abejas *Scaptotrigona mexicana* en ollas de barro (M. en C. Jorge Jiménez).

## **2.4 IMPORTANCIA DE LAS ABEJAS SIN AGUIJÓN**

El beneficio más importante que proporcionan es la polinización. La polinización es importante porque a través de ella se reproducen muchas plantas. La polinización es la transferencia de polen de la antera (parte masculina de flor) al estigma (parte femenina), ya sea de la misma flor o de flores de la misma especie. Con esta transferencia de polen ocurre la fertilización de la planta, posteriormente sigue la formación de semillas y frutos que dan a su vez nuevas plantas o son alimento para nosotros los humanos y otros animales. Con la polinización se benefician mutuamente la planta y la abeja. La planta logra su reproducción y las abejas son recompensadas con néctar y polen [3]. En general, el viento y las abejas son los polinizadores más importantes y en menor porcentaje las mariposas, los colibríes y los murciélagos. Un tercio de los alimentos consumidos por los humanos dependen de la polinización animal, pues polinizan muchos cultivos agrícolas [9]. Por lo tanto, si no tuviéramos abejas nuestra cantidad y diversidad de alimentos se vería muy reducida. Las abejas están estrechamente relacionadas con la seguridad alimentaria de la especie humana y con el equilibrio ecológico, y a través de la polinización garantizan la diversidad de plantas necesaria para la existencia del conjunto de animales [3], [9]–[12].

Las abejas sin aguijón son importantes por las siguientes razones [2]:

1. Son las abejas nativas más comunes [4].
2. Debido a la gran gama de su tamaño, que va de 1.8 a 13.5 mm y la capacidad de polinizar por vibración de algunas de las especies (conocida como polinización tipo buzz, por el sonido que se produce), las abejas sin aguijón logran polinizar una mayor diversidad de flores, ya que en los trópicos existen

flores de diferentes tamaños y formas, así como flores que necesitan la polinización por vibración [5], [6].

3. Las abejas sin aguijón son importantes polinizadoras tanto de la flora silvestre como de diferentes cultivo [2].
4. Tienen una alta capacidad de reclutamiento de individuos de la colmena para el pecoreo [13], además de la constancia en la visita de las flores [14], lo que permite una polinización eficiente de plantas cuyo periodo de floración es breve, como por ejemplo de la planta del café [15].

Como no tienen aguijón, algunas especies de estas abejas se prestan para la polinización en invernaderos [16].

## **2.5 LA MIEL Y SU COMPOSICIÓN**

La miel (Figura 3) es definida como una sustancia natural dulce, producida por las abejas que recogen y procesan el néctar de las flores o de las secreciones de ciertas especies de plantas y que transforman y combinan esta sustancia con otras específicas propias que finalmente almacenan y maduran en panales [17].

La composición de la miel depende de los tipos de flores visitadas por las abejas. El color, sabor y la constitución de la miel puede variar según las condiciones geográficas en las cuales se produjo esta, la variedad de las abejas que la produjo y el tipo de flores que han proporcionado el néctar, es por eso por lo que podemos observar mieles con color desde blanco transparente, hasta ámbar oscuro [2].

En general, los principales componentes de las mieles de abejas son: agua, diferentes azúcares (principalmente glucosa, fructosa y sacarosa), minerales, sustancias nitrogenadas, enzimas, fitonutrientes, vitaminas, entre otras sustancias [2].

El rango de oscilación natural de sus más de 180 componentes de la miel hace imposible definir unos valores exactos de composición. El contenido en agua es del 17-20%, la proporción de hidratos de carbono del 75-80%, de proteínas del 0.3% y el contenido de sales de potasio, es del 0.2%. Entre los 20 hidratos de carbono diferentes de fácil absorción que contiene predomina la fructosa con un 38%. La proporción de glucosa alcanza el 31%, seguida de maltosa y sacarosa [18], [19]. Su contenido en vitaminas es muy bajo. Entre los minerales resulta llamativo la alta proporción de cromo, con 290 µg/kg. El contenido en polen es del 0.5%. Su elevado contenido en enzimas es importante desde el punto de vista fisiológico y nutricional así como el de inhibinas ya que estas tienen efecto antimicrobiano [20].

El poder antibacteriano de la miel se debe principalmente a que esta contiene inhibinas. Estas inhibinas consisten en peróxido de hidrógeno, flavonoides y ácidos fenólicos, además de otras sustancias sin identificar, aunque otros investigadores atribuyen la capacidad antibacteriana de miel a la combinación de propiedades tales como su alta osmolaridad y bajo pH [1].

También las enzimas tienen un papel importante ya que se consideran un requisito indispensable para que la miel posea efecto bactericida. Además de la amilasa y la sacarasa, sobre todo a la glucosidasa, se le atribuye una gran importancia. Esta enzima es capaz de descomponer la glucosa en ácido glucurónico y peróxido de hidrógeno el cual es un bactericida [20].



**Figura 3.** Miel de la abeja *Scaptotrigona mexicana* (M. en C. Jorge Jiménez).

## **2.6 HISTORIA DE LA MIEL**

Los beneficios de la miel se conocen desde hace miles de años y ha sido utilizada en la antigüedad por su valor nutritivo y medicinal. Las primeras evidencias del consumo de la miel aparecen en pinturas rupestres del Mesolítico, unos 6000 años a.C. y su uso como medicamento unos 2500 años a.C. por los sumerios en Mesopotamia. Entre los usos médicos, desde la antigüedad la miel ha servido en el cuidado de heridas.

Los antiguos egipcios, los asirios, los chinos, los griegos y los romanos utilizaban la miel para tratar heridas y enfermedades del intestino [1]. En los papiros de Eberts y Smith, que datan de 1500 a.C. ya se aconsejaba tratar con miel las heridas. Hipócrates, en su obra "Consideraciones sobre el tratamiento de las heridas", recomienda curarlas con miel [17], [21]–[24]. En la Grecia antigua, Aristóteles afirmaba que la miel podría aplicarse como un ungüento para las heridas y el dolor de ojos [1].

Dioscórides alrededor del año 50 d.C. recomendaba a la miel para el tratamiento de quemaduras del sol, manchas en la cara y las heridas infectadas [1].

Después de haber cumplido un papel importante en la tradición médica de muchos pueblos, la miel fue "redescubierta" por la medicina moderna debido a sus importantes propiedades bactericidas en heridas infectadas con bacterias resistentes a los antibióticos [25], [26]. Desde entonces, numerosos estudios han centrado su interés en demostrar que las propiedades biológicas y físicas de la miel le confieren una gran eficacia en el tratamiento de heridas de diversas etiologías [21], [24] y que su uso ofrece un tratamiento natural alternativo en la población mundial que reducen el costo de los tratamientos modernos [17], [27], [28].

## **2.7 EFECTOS TERAPÉUTICOS DE LA MIEL**

La miel presenta un conjunto de propiedades que contribuyen significativamente en el proceso de cicatrización de heridas. Muestra un efecto antibacteriano en heridas susceptibles a infecciones o infectadas, actividad antioxidante que reduce la alta concentración de radicales libres y especies reactivas de oxígeno (ROS) producidas en la etapa inflamatoria, actividad antiinflamatoria, reduce rápidamente el dolor, edema y exudado de las heridas, eliminación del tejido muerto, dañado o infectado para mejorar el tejido restante, estimula la contracción de la herida favoreciendo el cierre de la misma y muestra propiedades cicatrizantes que reducen al mínimo su apariencia [17], [29]–[33].

En quemaduras, sus propiedades antibacterianas hacen que sea un agente natural adecuado para facilitar el control microbiano de heridas infectadas. Para ello, cuenta con un conjunto de factores que afectan directamente a los microorganismos

patógenos. [34]–[36]. Estos factores comprenden la acción del peróxido de hidrógeno, la alta osmolaridad, la acidez y factores no basados en peróxido, tales como el péptido antimicrobiano de abeja defensina-1[8] y compuestos fenólicos, tales como flavonoides [17], [37].

Las acciones antimicrobianas indirectas incluyen aumento en la producción de linfocitos, anticuerpos, citoquinas y el fortalecimiento del propio sistema inmunológico [21], [38]–[40]. Actualmente, pocos antibióticos son eficaces frente a bacterias multiresistentes. Así, varios estudios han combinado la miel con fármacos antimicrobianos comerciales [41], [42]. Estas combinaciones son ventajosas y comúnmente utilizadas en tratamientos, principalmente porque proporcionan un amplio espectro de actividad debido, fundamentalmente por retrasar/suprimir la aparición de una población microbiana resistente a fármacos [17], [43], [44].

La actividad antioxidante intrínseca de la miel, incluyen la inactivación y la supresión de ROS por los fagocitos en los tejidos inflamados y disminución del estrés oxidativo mediante el control de los radicales libres que se forman en la quemadura de la herida. La supresión de ROS, inhibe a los fibroblastos y conduce a la cicatrización. Según Tonks [45], la miel al contener peróxido de hidrógeno demostró ser inhibidora de la producción de ROS [17].

Numerosos estudios han demostrado que las mieles más oscuras tienen mayor poder antioxidante por ser más ricas en compuestos fenólicos como flavonoides. Es conocido que los compuestos fenólicos contribuyen significativamente a la capacidad antioxidante de la miel, pero no son los únicos responsables de esta propiedad. Otros compuestos asociados a la actividad antioxidante de la miel son el ácido ascórbico, vitaminas del complejo B, tocoferoles, catalasa, superóxido dismutasa, glutatión

reductasa, péptidos, aminoácidos y selenio [46]–[52]. Por lo tanto, la capacidad antioxidante de la miel es probablemente el resultado de las interacciones sinérgicas entre los distintos componentes que tiene [17].

Las evidencias sostienen que la miel tiene un efecto favorable sobre la regeneración de heridas, contribuyendo de manera significativa en el proceso de cicatrización no solo a través de su propiedad antioxidante, sino que también, a través de su capacidad antiinflamatoria [17], [23].

La cicatrización de heridas es un proceso de regeneración de tejidos que incluye la inflamación como un primer paso. A veces, estos procesos de curación son inhibidos por terapias con fármacos que lo retrasan, en consecuencia, se podrían utilizar nuevos agentes antiinflamatorios que no afecten estos procesos. Por otro lado, aunque la inflamación es parte del proceso normal de la cicatrización, puede hacer incómoda la herida y de difícil manejo y, si se prolonga en el tiempo, puede evitar que el tejido de reparación de la herida continúe los procesos de curación [53].

Un producto natural como la miel es una buena alternativa para este fin, ya que no produce los efectos secundarios de algunos fármacos y propicia la cicatrización [54]. Un buen número de ensayos clínicos apoyan esta propiedad de la miel, informando la reducción de los síntomas de la inflamación después de la aplicación tópica de la miel en las heridas, con disminución del edema y exudado [17], [23], [32], [55], [56].

## **2.8 PROBLEMÁTICA DE BACTERIAS RESISTENTES**

Las infecciones causadas por organismos resistentes a los antibióticos (ORAs) podrían llegar a ser consideradas como una infección emergente, debido a que su tratamiento es cada vez más limitado con el potencial de afectar a todas las personas

en el mundo, tanto en países con mayores recursos económicos como en aquellos en vías de desarrollo [57].

El uso de antibióticos en la atención en salud es reciente en la historia de la humanidad con el descubrimiento de la penicilina en 1928, seguido por el uso extenso durante la Segunda Guerra Mundial. Poco después, la bacteria del género *Staphylococcus* desarrolló resistencia a la penicilina lo que inició el surgimiento de resistencia cuya tendencia se aceleró en las décadas subsiguientes. En estos días es común encontrar aislamientos bacterianos tanto en el entorno clínico como en el ambiente con diferentes niveles de resistencia tales como los multidrogosresistentes (MDR; resistente a 2 o más antibióticos), extremadamente resistentes (XDR; resistente a 3 o más antibióticos), y aislamientos panresistentes, los cuales son literalmente intratables con los regímenes farmacológicos actuales, incluyendo terapias combinadas. La estrategia ha sido continuar la búsqueda de nuevos antibióticos naturales así como desarrollar modificaciones sintéticas de antibióticos existentes para recuperar eficacia [57].

Se conoce que el entorno clínico constituye una fuente de resistencia a los antibióticos, debido al uso ampliamente extendido de medicamentos, que produce una presión natural selectiva en las bacterias. La aparición de resistencia a los antibióticos en los países en desarrollo es una preocupación en todo el mundo, debido al uso no regulado de antibióticos en hospitales y lugares de suministro de medicamentos (farmacias, supermercados, y el mercado negro) de estos países, que va de la mano con la selección inadecuada de medicamentos, la dosificación equivocada, y la mala adherencia del paciente al tratamiento, lo que representa una gran oportunidad para el cultivo de bacterias resistentes [58].

Los primeros datos publicados por la Organización Mundial de la Salud sobre la vigilancia de la resistencia a los antibióticos indican que los niveles de resistencia a algunas infecciones bacterianas graves son elevados tanto en los países de ingresos altos como en los de ingresos bajos [59].

El nuevo Sistema Mundial de Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos de la Organización, denominado GLASS por sus siglas en inglés, ha revelado la presencia generalizada de resistencia a los antibióticos en muestras de 500 000 personas de 22 países en las que se sospechaban infecciones bacterianas [59].

Las bacterias resistentes más frecuentes eran *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae*, seguidas de *Salmonella* spp. El sistema GLASS no incluye datos sobre las resistencias de *Mycobacterium tuberculosis* (el bacilo que causa la tuberculosis), del que la OMS hace un seguimiento desde 1994 y del que publica actualizaciones anuales en su Informe Mundial sobre la Tuberculosis [59].

## **2.9 AGENTES ETIOLÓGICOS DE GRAN INTERÉS**

### **2.9.1 *Escherichia coli***

*Escherichia coli* es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo. Es una bacteria que normalmente vive en los intestinos de las personas y los animales. Hay muchos tipos diferentes de *E. coli*. La mayoría de la *E. coli* se encuentra de forma natural en nuestros intestinos y desempeña un papel importante en ayudar a nuestro cuerpo a digerir los alimentos. Sin embargo, algunos tipos de *E. coli* pueden provocar diarrea y otras enfermedades cuando se ingieren [60].

Las diferentes cepas de esta bacteria en humanos se clasifican por su patogenicidad en categorías diferentes: enterotoxigénica (ETEC), enteroinvasiva (EIEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroagregativa (EAaggEC) y enteropatógena (EPEC). Las cepas del grupo EPEC son responsables de diarrea en niños menores, principalmente de países en desarrollo [61].

#### **2.9.1.1 *Escherichia coli* enteropatógena**

*Escherichia coli* enteropatógena es el agente causal de diarrea en niños de dos años, que causa frecuentemente brotes epidémicos en lugares cerrados como guarderías y hospitales. La enfermedad puede ser moderada a grave y se ha asociado a alta mortalidad (10-40%), principalmente en los países en vías de desarrollo. En el año 2010 se notificaron 121.455 muertes por este patotipo [62]. El período de incubación es de 3 a 24 h y el cuadro diarreico puede tornarse persistente y acompañarse de fiebre y vómito [63].

Las cepas de EPEC se dividen en típicas y atípicas, por la presencia (típicas) o ausencia (atípicas) de un plásmido de virulencia llamado factor de adherencia de EPEC (EAF: *EPEC adherence factor*) [64].

La caracterización de las cepas atípicas ha cobrado importancia debido a que su aislamiento ha aumentado no sólo en niños asintomáticos sino también en niños con diarrea durante brotes epidémicos de diarrea [63].

#### **2.9.2 *Salmonella* Typhimurium**

La bacteria *Salmonella* Typhimurium es un bacilo Gram negativo de la familia Enterobacteriaceae. La infección se adquiere mediante la ingestión de alimentos o agua contaminados, la principal fuente de la infección son los portadores

asintomáticos. El padecimiento tiene un periodo de incubación de aproximadamente 10 días. El cuadro clínico se caracteriza por fiebre, cefalea, malestar general, diarrea o constipación, en ocasiones puede haber exantema, desorientación y estado toxiinfeccioso; el padecimiento puede complicarse con perforación intestinal o choque séptico que pueden llevar a la muerte [65].

En los últimos años, diversos estudios han reportado un aumento de la resistencia antimicrobiana en cepas de *Salmonella* spp aisladas de alimentos de origen animal [15]. La creciente resistencia antimicrobiana de *Salmonella* spp ha sido atribuida al uso extenso de antibióticos, tanto en la terapéutica humana como animal [66]. En la industria pecuaria en particular, los antibióticos no solo son utilizados con fines terapéuticos, sino que, además, se utilizan como promotores de crecimiento en dosis terapéuticas sin efecto durante largos periodos [56], [67].

### **2.9.3 *Staphylococcus aureus***

La bacteria *Staphylococcus aureus* está formada por cocos Gram positivos, con un diámetro de 0.5 a 1.5  $\mu\text{m}$ , agrupados como células únicas, en pares, tétradas, cadenas cortas o formando racimos de uvas. Son bacterias no móviles, no esporuladas, no poseen cápsula, aunque existen algunas cepas que desarrollan una cápsula de limo, son anaerobias facultativas. La mayoría de los estafilococos producen catalasa que es una enzima capaz de desdoblar el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno libre [68].

*Staphylococcus aureus* es la principal especie patógena de su género, causa común de infecciones diversas, tanto de origen comunitario como hospitalario. El interés actual del estudio de este patógeno deriva, bien de su elevada frecuencia, o por

representar, en el caso de cepas resistentes a meticilina (aislados SARM), una de las principales causas de brotes de infección nosocomial [69].

La variabilidad de *S. aureus*, la rápida respuesta adaptativa frente a cambios del medio, y su continua adquisición de determinantes de resistencia antibiótica, han hecho de éste un residente habitual del hábitat hospitalario, donde origina problemas de multiresistencia, ocasionalmente importantes. Aunque el término resistencia a meticilina incluye resistencia a derivados  $\beta$ -lactámicos, las cepas SARM presentan, en general, resistencia múltiple a varios grupos de antibióticos [69].

El principal reservorio de *S. aureus* es el ser humano, hallándose en los portadores sanos, especialmente en las fosas nasales, así como en los pacientes infectados. La colonización puede asentar sobre la mucosa nasal, orofaringe, epidermis íntegra, úlceras crónicas cutáneas, heridas en fase de cicatrización o en la uretra de portadores de sonda [69].

*S. aureus* posee una gran capacidad para sobrevivir en ambientes desfavorables y, por la acción de sus determinantes de patogenicidad, acaba produciendo infección [69].

La infección se produce, en general, en zonas con alteraciones previas de la barrera mucocutánea debidas a heridas traumáticas, intervenciones quirúrgicas, instrumentación, drogadicción parenteral, enfermedades dermatológicas, úlceras isquémicas, etc. A partir de esta fuente endógena, *S. aureus*, que se comportaba hasta entonces como comensal, rompe el delicado equilibrio que impedía su capacidad de proliferación y ocasiona una infección local o generalizada [69].

La bacteria *S. aureus* causa enfermedades por invasión directa de los tejidos y por producción de toxinas. Por invasión directa causa infecciones cutáneas, neumonía,

endocarditis, osteomielitis, artritis séptica, etc. Por producción de toxinas causa el síndrome de shock tóxico, síndrome de la piel escaldada y toxiinfección alimentaria.

#### **2.9.4 *Streptococcus mutans***

*Streptococcus mutans* es un coco Gram positivo, en cadena, no móvil, catalasa negativo, productor rápido de ácido láctico con capacidad de cambiar un medio de pH 7 a pH 4.2 en, aproximadamente, 24 horas [70], [71].

De las enfermedades infecciosas que afectan a los seres humanos, la caries dental es la más prevalente. Se describe la caries dental como un proceso dinámico de desmineralización y remineralización, producto del metabolismo bacteriano sobre la superficie dentaria, que con el tiempo puede producir una pérdida neta de minerales y posiblemente, aunque no siempre, resultará en la presencia de una cavidad [70], [72].

Las bacterias orales pertenecen a una comunidad compleja de numerosas especies que participan en la formación de la placa bacteriana (biofilm o biopelícula) con todas sus funciones, interacciones y propiedades. Varios microorganismos se incluyen en la patogénesis de la caries dental de los cuales, *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) es el agente más importante asociado a ella. La caries y la periodontitis son causadas por un desequilibrio en las poblaciones bacterianas de biopelículas que se forman naturalmente y ayudan a mantener el estado normal de la cavidad oral [70], [72].

Las caries se debe a los múltiples factores que están asociados con la evolución de una población bacteriana que pasa de una biopelícula saludable a otra patológica. Una biopelícula sana puede estar formada por más de 700 especies bacterianas, de las cuales menos del 1% son bacterias potencialmente patogénicas; una biopelícula saludable actúa como defensa de primera línea para ayudar a proteger la boca de

infecciones por bacterias patogénicas u otros patógenos. Cambios en el medio dentro de la biopelícula hacen que se favorezca la proliferación de especies patogénicas acidúricas y acidogénicas y tomen posesión de la misma [70], [73].

Las poblaciones formadoras de biopelículas también pueden alcanzar altas densidades en áreas confinadas como es el caso de válvulas cardíacas, aparatos prostéticos, criptas amigdalinas, senos nasales, pasajes respiratorios terminales y lesiones infecciosas de piel, de ahí, su importancia como patógeno oportunista fuera de la cavidad oral [70], [74], [75].

### **2.9.5 *Streptococcus pyogenes***

*Streptococcus pyogenes* es una bacteria con forma de coco Gram positivo que se agrupa en cadenas. *S. pyogenes* es responsable de distintas infecciones con cierta gravedad que, por orden de frecuencia, son: faringitis, infecciones cutáneas (impétigo y erisipela) y de tejidos blandos, sepsis puerperal, neumonía, endocarditis, meningitis y artritis. Incluso origina cuadros de fiebre escarlatiniforme y el síndrome del shock tóxico, debido a cepas productoras de toxinas [76].

No obstante, el cuadro clínico más frecuente causado por *S. pyogenes* es la faringitis.

Se caracteriza por dolor faríngeo seguido de fiebre, cefalea, náuseas y vómitos [76].

El tratamiento de elección contra las enfermedades producidas por *S. pyogenes* es la penicilina. Su eficacia clínica se basa en la excelente sensibilidad que presentan a este antibiótico todas las cepas del agente causal. No se ha constatado la aparición de cepas resistentes o con sensibilidad disminuida a ese antibiótico. Sin embargo la alergia a la penicilina, confirmada o supuesta, hace que, en un buen número de casos, los clínicos la descarten para el tratamiento, y por precaución. Por eso mismo los macrólidos se consideran el tratamiento alternativo en la faringoamigdalitis

estreptocócica, donde han demostrado ser tan eficaces y seguros como las penicilinas [76].

Los macrólidos son un grupo de antibióticos que se consideran el tratamiento alternativo en la faringoamigdalitis estreptocócica, donde han demostrado ser tan eficaces y seguros. Por ello figuran en las guías actuales de terapéutica antimicrobiana y se usan ampliamente. En algunas cepas de *S. pyogenes* existe un mecanismo de resistencia a los macrólidos que se adquiere a través de plásmidos. Por ello, cuando una cepa presenta este mecanismo de resistencia se pierde la sensibilidad a todos los macrólidos [76].

### **3. OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN**

#### **3.1 Objetivo general**

Determinar el efecto sobre el crecimiento de bacterias de interés clínico de mieles producidas por las abejas *Scaptotrigona mexicana* provenientes de Cuetzalan Puebla.

#### **3.2 Objetivos particulares**

**3.2.1** Determinar la concentración mínima inhibitoria de diversas mieles provenientes de Cuetzalan Puebla producidas por la abeja *Scaptotrigona mexicana* sobre agentes etiológicos de gran interés.

**3.2.2** Determinar la concentración mínima bactericida de diversas mieles provenientes de Cuetzalan Puebla producidas por la abeja *Scaptotrigona mexicana* sobre agentes etiológicos de gran interés.

**3.2.3** Comprobar el efecto inhibitorio de las mieles de prueba, realizando curvas de crecimiento de los agentes etiológicos estudiados.

### **3.3 Justificación**

La prevalencia global de enfermedades infecciosas, incluyendo las bacterianas, en conjunto con la resistencia a los antibióticos, se ha convertido en una de las mayores cargas para los sistemas de salud en el mundo, resultando en prolongadas enfermedades, discapacidades y muertes [77]. Las estadísticas indican que tan solo en los Estados Unidos más de 2 millones de habitantes con infecciones y 23,000 muertes pueden ser atribuidas a la resistencia a los antibióticos, mientras que en Europa estas infecciones se estiman en 25,000 muertes al año [78].

Recientemente, se ha renovado el interés en el rol de los productos naturales en el descubrimiento y desarrollo de fármacos debido a la accesibilidad que se tiene en los países en desarrollo como México, a los menores costos y a los menores efectos colaterales asociados a los fármacos sintéticos.

Las plantas medicinales y productos naturales han constituido la base para procurar la salud en todo el mundo desde tiempos remotos, siguen utilizándose ampliamente y tienen una importancia considerable en el mundo actual. Si bien la medicina moderna está bien desarrollada en algunas regiones desarrolladas, en los países en vías de desarrollo grandes sectores de la población todavía dependen de los curanderos, plantas medicinales, medicamentos herbolarios y recursos tradicionales para el alivio de sus enfermedades. De tal manera que la OMS estima que 1,500 millones de seres humanos recurren a medicinas y terapias tradicionales para la atención primaria de la salud, estos sin contar a los usuarios de medicamentos obtenidos a partir del procesamiento industrial de las plantas medicinales. El 95% de estas terapias son de origen vegetal. Es más, durante los últimos años, el interés por las terapias vegetales tradicionales ha aumentado enormemente en los países industrializados, por lo tanto,

el uso de productos de origen vegetal y medicamentos herbolarios se encuentra en plena expansión, reconociéndose el valor clínico de los productos utilizados en las prácticas médicas alternativas. Desafortunadamente, en México el porcentaje de especies vegetales medicinales, propóleos y mieles estudiados desde el punto de vista químico y farmacológico es relativamente bajo. Las mieles de México han sido un poco más estudiadas y utilizando la misma base se encontraron artículos describiendo los problemas que ocasionan en las colmenas parásitos como el ácaro *Varroa destructor*, la composición química y en menor medida la actividad biológica de estas. Con base en estos antecedentes, resulta evidente que en la actualidad solo se tiene un conocimiento empírico sobre la utilización de las mieles y propóleos en la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de diferentes padecimientos, ya que a la fecha no se han hecho estudios sistemáticos tendientes a determinar sus efectos. Es importante destacar que las mieles mexicanas gozan de una gran reputación para el tratamiento de enfermedades, sin embargo, existen muy pocos estudios químicos y farmacológicos previos que permitan validar estos usos.

#### **4. DESARROLLO EXPERIMENTAL**

##### **4.1 Recolección de muestras**

Las 10 muestras de miel se obtuvieron de distintos meliponarios provenientes de Cuetzalan, Puebla. La recolección de estas estuvo a cargo del Maestro en Ciencias Jorge Jiménez Díaz del 20 de marzo al 20 de mayo de 2017. Las muestras de miel se conservaron en un refrigerador, en envases perfectamente sellados y sin exposición a la luz.

#### 4.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria

La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) se define como la mínima concentración de antimicrobiano que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo después de 24 horas de incubación a 37°C, es decir, aquella concentración de las mieles en las que visualmente no existió crecimiento.

La determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) para cada muestra se realizó siguiendo el método de microdilución en placa de 96 pozos y las recomendaciones del CLSI [79]. Para la determinación a cada pozo se le adicionaron 100 µL de caldo de infusión de cerebro corazón (BHI), como paso siguiente se realizaron las diluciones seriadas de las mieles y los controles para evaluar las muestras de miel a distintas concentraciones. Como control negativo se inoculó la bacteria al medio (BHI), los controles positivos fueron digluconato de clorhexidina al 0.12% y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3%. Posteriormente, se agregaron 80 µl de medio BHI y 20 µL de la bacteria a una concentración de 0.5 (1 × 10<sup>6</sup> UFC / mL) en escala de Mc Farland, dicha concentración bacteriana fue ajustada tomando 50 µL del cultivo conservado en glicerol de cada cepa de la bacteria a ajustar, se agregaron a viales con 5 mL de medio de cultivo BHI, los cuales se incubaron a 37 ° C durante 17 horas. Se tomaron 50 µL de este nuevo cultivo y se inocularon en 5 mL de medio BHI, se incubaron nuevamente a 37 ° C durante 4 horas. Después, se realizaron las diluciones para obtener una densidad óptica (D.O.) de 0.01 para alcanzar una concentración bacteriana de 0.5 (1 × 10<sup>6</sup> UFC/mL) de la bacteria a utilizar durante el ensayo. Las bacterias utilizadas fueron *Escherichia coli* (108412), *Escherichia coli* enteropatógena (95217), *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Streptococcus mutans* (ATCC 10449) y *Streptococcus pyogenes* (SIN CLAVE, FAC.

MEDICINA). Finalmente, se incubaron las cajas a una temperatura de 37°C por un período de 24 horas, cada miel y cada control se probaron por duplicado.

#### **4.3 Determinación de la concentración mínima bactericida**

La Concentración Mínima Bactericida (CMB) se definió como la mínima concentración de antimicrobiano que elimina a más del 99.9% de los microorganismos viables después de un tiempo determinado de incubación (generalmente 24 horas) [80].

Para este ensayo se siguió la metodología de microdilución en placa de 96 pozos y las recomendaciones del CLSI [79]. Posteriormente se realizó la metodología descrita previamente para la MIC y como paso final se adicionaron 20 µL de resazurina (SIGMA) a todos los pozos y se incubó a 37°C por 15 minutos. Una coloración azul o morada en los pozos significa que no hubo crecimiento bacteriano y una coloración rosa en los pozos significa que si hubo crecimiento bacteriano.

#### **4.4 Determinación de la actividad de las mieles de *Scaptotrigona mexicana* sobre el crecimiento bacteriano**

Para evaluar el efecto de las mieles recolectadas sobre el crecimiento bacteriano se realizó la metodología de microdilución en placa de 96 pozos y las recomendaciones del CLSI [79]. Posteriormente, se leyeron las placas de 96 de pozos en un lector de placas marca Biotek a 600 nm, siendo la primera lectura el minuto 0. Después se leyó la placa de 96 pozos cada 30 minutos durante las dos primeras horas, pasando estas dos horas las placas se leían cada hora, durante todo el experimento las placas se mantuvieron incubadas a 37° C. Las curvas se realizaron con las bacterias que presentaron mayor inhibición y muerte en las metodologías de CMI y CMB, las cuales son (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans* y *Streptococcus pyogenes*).Y se

realizó la técnica con las mieles que presentaron mayor potencia antimicrobiana en las metodologías de CMI y CMB.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Determinación de la concentración mínima inhibitoria sobre los agentes etiológicos de interés

La concentración mínima inhibitoria se determinó a las seis bacterias frente a las diez mieles antes mencionadas.

En el Cuadro 1 se resumen todos los resultados de la Concentración Mínima Inhibitoria % (p/v) y se observa que las mieles tuvieron una mayor actividad inhibitoria sobre el crecimiento de la bacteria *Streptococcus mutans* (Gram positiva) respecto a las demás bacterias, ya que mostró un MIC de 3.125 % (p/v) en siete mieles y en las tres mieles restantes como se puede apreciar en el Cuadro 1, tuvieron un considerable efecto inhibitorio sobre la bacteria. La inhibición del crecimiento sobre *Streptococcus mutans* es importante ya que es una bacteria patógena que produce caries dental siendo el agente más importante asociado a dicha patogenia [70], [72].

En el caso de la bacteria *Staphylococcus aureus* (Gram positiva) presenta un MIC de 6.25 % en cinco mieles y una inhibición considerable de la bacteria por efecto de las mieles restantes, como se muestra en el Cuadro 1. Las mieles tienen un efecto eficaz antimicrobiano sobre la bacteria, ya que todas las mieles inhiben el crecimiento de la bacteria, lo cual es trascendental ya que *Staphylococcus aureus* es una bacteria con cepas resistentes a metilina incluyendo resistencia múltiple a varios grupos de antibióticos [69]. Esto es de suma importancia ya que la bacteria *Staphylococcus aureus* causa diversas enfermedades por invasión directa de los tejidos y por producción de toxinas.

En el Cuadro 1 se aprecia que las mieles tienen actividad antibacteriana sobre *Streptococcus pyogenes* (Gram positiva), ya que la bacteria presenta mayor inhibición

por el efecto antibacteriano de las mieles 2, 3 y 4 las cuales tienen un MIC de 12.5 %, (p/v), dicho esto se observa también que la bacteria presenta inhibición por la actividad antibacteriana de las siete mieles restantes con un MIC de 25 % (p/v). Estos resultados son considerables ya que la bacteria *Streptococcus pyogenes* es un agente etiológico de gran importancia porque es responsable de distintas infecciones con cierta gravedad como: faringitis, infecciones cutáneas (impétigo y erisipela) y de tejidos blandos, sepsis puerperal, neumonía, endocarditis, meningitis y artritis. Incluso origina cuadros de fiebre escarlatiniforme y el síndrome del shock tóxico, debido a cepas productoras de toxinas [76].

Las mieles tienen poca actividad sobre el crecimiento de la bacteria *Salmonella typhimurium*, ya que esta presenta poca inhibición con cuatro de las mieles resumidas en el Cuadro 1 teniendo un MIC del 50 % (p/v), el resto de las mieles no tienen actividad sobre el crecimiento de la bacteria. Por otro lado *Escherichia coli enteropatógena* (Gram negativa), es una bacteria que fue inhibida por un mayor número de mieles respecto a las dos bacterias Gram negativas (*Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*). Las mieles que inhibieron el crecimiento de *Escherichia coli enteropatógena* con un MIC del 50 % (p/v) fueron ocho mieles que se observan en el Cuadro 1, esto es relevante ya que esta bacteria es el agente causal de diarrea en niños de dos años, que provoca frecuentemente brotes epidémicos en lugares cerrados como guarderías y hospitales [62]. Finalmente ninguna de las mieles tuvo efecto inhibitorio del crecimiento de la bacteria *Escherichia coli* (108412).

Analizando el cuadro 1 se aprecia que las mieles tienen actividad inhibitoria sobre el crecimiento de las bacterias Gram positivas. Sin embargo se observa que las mieles tienen una menor o nula actividad inhibitoria sobre el crecimiento de las bacterias

Gram negativas. Esto se debe a que las bacterias Gram negativas tienen una membrana celular externa que cubre a la bacteria, en esta barrera de exclusión se encuentran lipopolisacáridos que están ubicados en la parte exterior de la membrana celular y es responsable de la capacidad patógena de estos microorganismos [81].

En el Cuadro 1 se observa que la mejor miel fue la 6, ya que inhibió el crecimiento de casi todas las bacterias a excepción de *Escherichia coli* y fue la que tuvo los MICs más bajos. La bacteria más sensible a las mieles fue la bacteria *Streptococcus mutans*, ya que su crecimiento fue inhibido por las diez mieles. Por otro lado la bacteria menos sensible fue *Escherichia coli*, ya que ninguna miel tuvo actividad inhibitoria sobre esta. Este resultado se asemeja a los estudios sobre calidad microbiológica y actividad antimicrobiana de la miel de abejas sin aguijón [82] donde las mieles evaluadas muestran efectos inhibitorios a concentraciones de 50 %, sin embargo ya no se reporta inhibición de la bacteria *Escherichia coli* a concentraciones de miel más bajas.

**Cuadro 1.** Resultados de la Concentración Mínima Inhibitoria % (p/v) de las diez mieles probadas y controles sobre bacterias Gram negativas y Gram positivas.

Muestra	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i> enteropatógena	<i>Salmonella Typhimurium</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus mutans</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
Miel 1	-	-	-	50	6.25	25
Miel 2	-	50	-	6.25	3.125	12.5
Miel 3	-	50	-	6.25	6.25	12.5
Miel 4	-	50	-	6.25	3.125	12.5
Miel 5	-	50	-	6.25	3.125	25
Miel 6	-	50	50	6.25	3.125	25
Miel 7	-	50	50	12.5	3.125	25
Miel 8	-	50	50	12.5	6.25	25
Miel 9	-	-	-	50	12.5	25
Miel 10	-	50	50	50	6.25	25
Control (+) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.09	0.05	0.05	0.09	0.02	0.05
Control (+) CHX	0.0009	0.0009	0.0005	0.0005	0.0009	0.00005
Control (-) Bacteria+BHI	-	-	-	-	-	-

**Nota:** El símbolo (-) indica que la bacteria no presentó inhibición.

## **5.2 Determinación de la concentración mínima bactericida sobre los agentes etiológicos de interés**

El indicador redox de resazurina permite probar la capacidad metabólica de las células (un signo de viabilidad celular). Las células viables conservan la capacidad de reducir la resazurina (azul) a la resorufina (rosa). Por otro lado, las células no viables pierden la capacidad metabólica, no reducen el colorante indicador por lo que las células no viables se quedan azules [83].

En el Cuadro 2 se resumen los resultados de la Concentración Mínima Bactericida de las seis bacterias mencionadas. Las diez mieles tienen un mayor efecto bactericida sobre la bacteria *Streptococcus mutans* (Gram positiva) respecto a las demás bacterias. Se puede observar en el Cuadro 2 que dicha bacteria tiene un MBC de 3.125 % (p/v) en cinco mieles y una concentración mínima inhibitoria considerable en las mieles restantes.

Las bacterias restantes a las que se les realizó el MBC tienen las mismas concentraciones que el MIC, es decir, que las mieles que tienen concentraciones las cuales inhiben el crecimiento de las bacterias también presentan actividad bactericida sobre el 99.9% de las bacterias a las mismas concentraciones.

Con esto podemos concluir que las mieles tienen un considerable efecto bactericida sobre las bacterias Gram positivas y tienen poco efecto bactericida sobre las bacterias Gram negativas. Observando el cuadro 2, se puede afirmar que la miel que tiene un mayor efecto bactericida es la 6 ya que tuvo una menor MBC respecto a las demás mieles. Las variaciones en la potencia bactericida de la miel son debido a que las abejas tienen diferente comportamiento nutricional y recogen las sustancias nutritivas

de diversas plantas y lugares por lo que las mieles producidas tendrán distintas composiciones y diferente valor medicinal [33].

**Cuadro 2.** Resultados de la Concentración Mínima Bactericida % (p/v) de las diez mieles probadas y controles sobre bacterias Gram negativas y Gram positivas.

Muestra	<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i> enteropatógena	<i>Salmonella</i> Typhimurium	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Streptococcus mutans</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
Miel 1	-	-	-	50	12.5	25
Miel 2	-	50	-	6.25	3.125	12.5
Miel 3	-	50	-	6.25	3.125	12.5
Miel 4	-	50	-	6.25	3.125	12.5
Miel 5	-	50	-	6.25	3.125	25
Miel 6	-	50	50	6.25	3.125	25
Miel 7	-	50	50	12.5	3.125	25
Miel 8	-	50	50	12.5	6.25	25
Miel 9	-	-	-	50	6.25	25
Miel 10	-	50	50	50	3.125	25
Control (+) H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.09	0.05	0.05	0.09	0.02	0.05
Control (+) CHX	0.0009	0.0009	0.0005	0.0005	0.0009	0.00005
Control (-) Bacteria+BHI	-	-	-	-	-	-

**Nota:** El símbolo (-) indica que la bacteria no presentó muerte.

### **5.3 Determinación de la actividad de las mieles de *Scaptotrigona mexicana* sobre el crecimiento bacteriano**

Las Gráficas 1-5 muestran un comportamiento similar donde se puede apreciar el efecto antimicrobiano de las mieles 2, 3, 4, 5 y 6 sobre el crecimiento de la bacteria *Staphylococcus aureus* a diferentes concentraciones. En un lapso de diez horas todas las concentraciones de la miel con la bacteria están por debajo del crecimiento de la bacteria *Staphylococcus aureus* sin tratamiento. Esto indica que estas mieles inhibieron el crecimiento de la bacteria a las concentraciones probadas. Las concentraciones de miel de 50 y 25% (p/v) inhibieron en su totalidad a la bacteria ya que no se observó ningún crecimiento, al igual que con los controles positivos de digluconato de clorhexidina y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

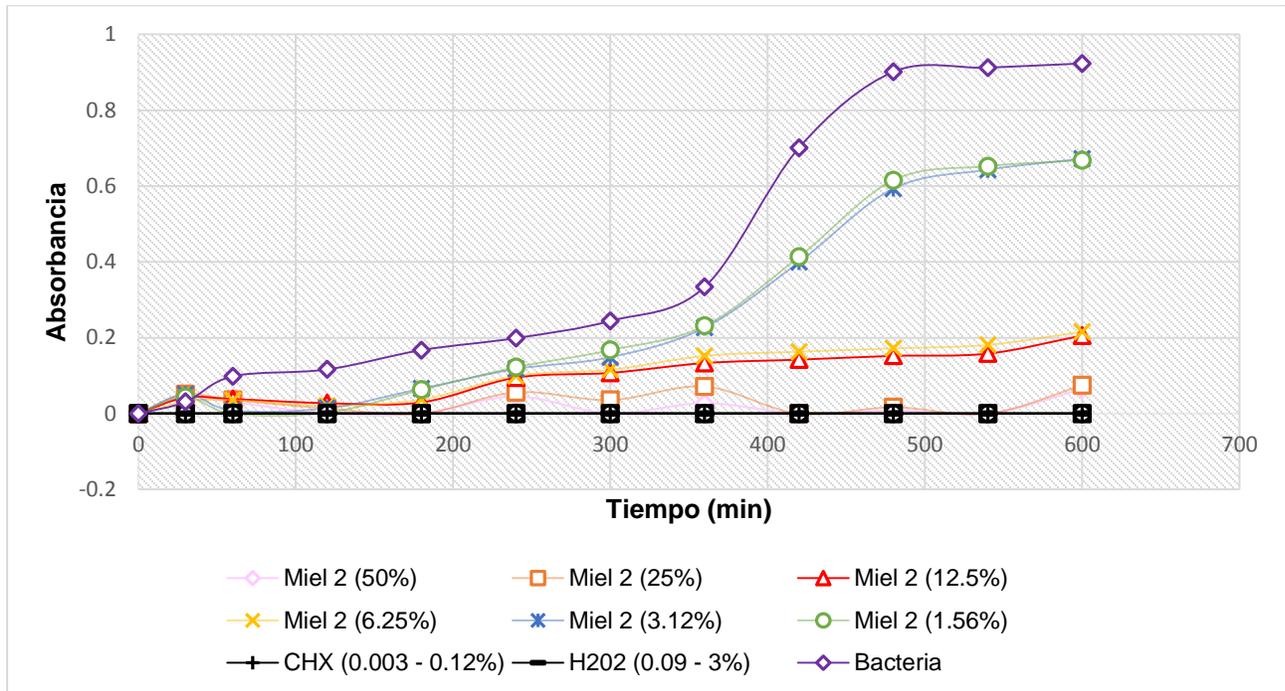
En las Gráficas 1-5, la actividad antibacteriana de las mieles 2, 3, 4, 5 y 6 a las concentraciones de 12.5 y 6.25 % (p/v) es muy potente ya que se observó una inhibición sobre el crecimiento de la bacteria a dichas concentraciones. Se aprecia en la Gráfica 4 que la miel 5 es la más eficaz inhibiendo el crecimiento de la bacteria.

En las Gráficas 1-5 se observa que la actividad de las mieles 2, 3, 4, 5 y 6 a las concentraciones de 3.12 y 1.56 % (p/v) ya no presentan mucha eficacia antibacteriana ya que la bacteria si tuvo crecimiento frente a dichas concentraciones, sin embargo se mantuvo inhibida ya que nunca llegó a tener un crecimiento tal como la bacteria *Staphylococcus aureus* sin tratamiento.

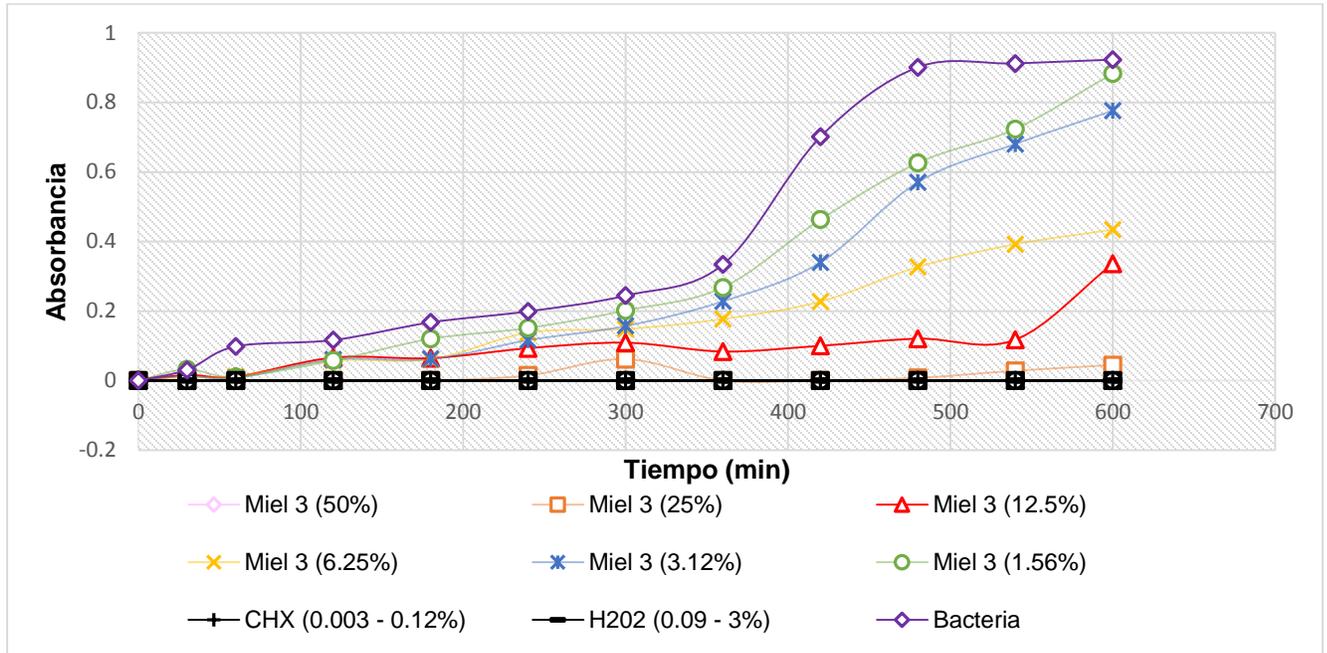
La bacteria *Staphylococcus aureus* presenta una considerable eficacia antibacteriana, esto coincide con un estudio sobre la calidad microbiológica y actividad antimicrobiana de la miel de abejas sin aguijón donde el género *Staphylococcus* fue el que presentó mayor susceptibilidad a la miel de abeja. Este hallazgo es importante dado que el

*S.aureus* es uno de los agentes más frecuentemente aislados a partir de heridas de pacientes y es una de las bacterias que presenta más resistencia contra antimicrobianos [82].

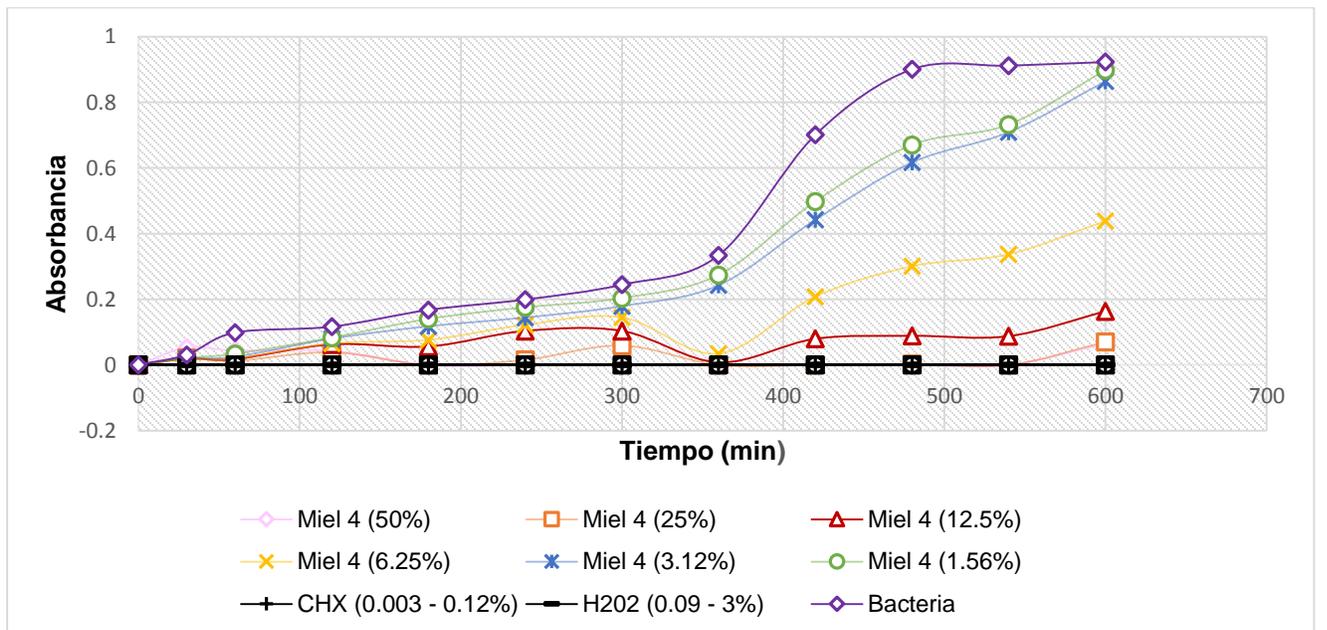
**Gráfica 1.** Inhibición de la bacteria *Staphylococcus aureus* frente a la miel 2 a diferentes concentraciones.



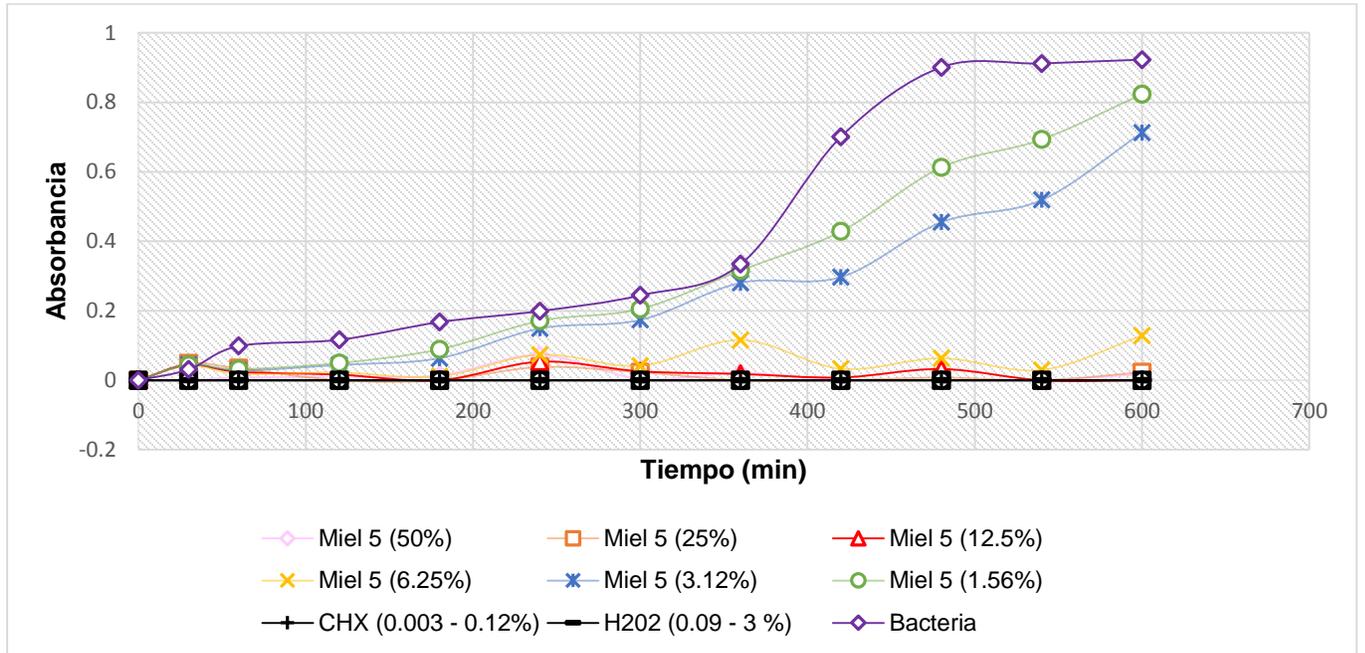
**Gráfica 2.** Inhibición de la bacteria *Staphylococcus aureus* frente a la miel 3 a diferentes concentraciones.



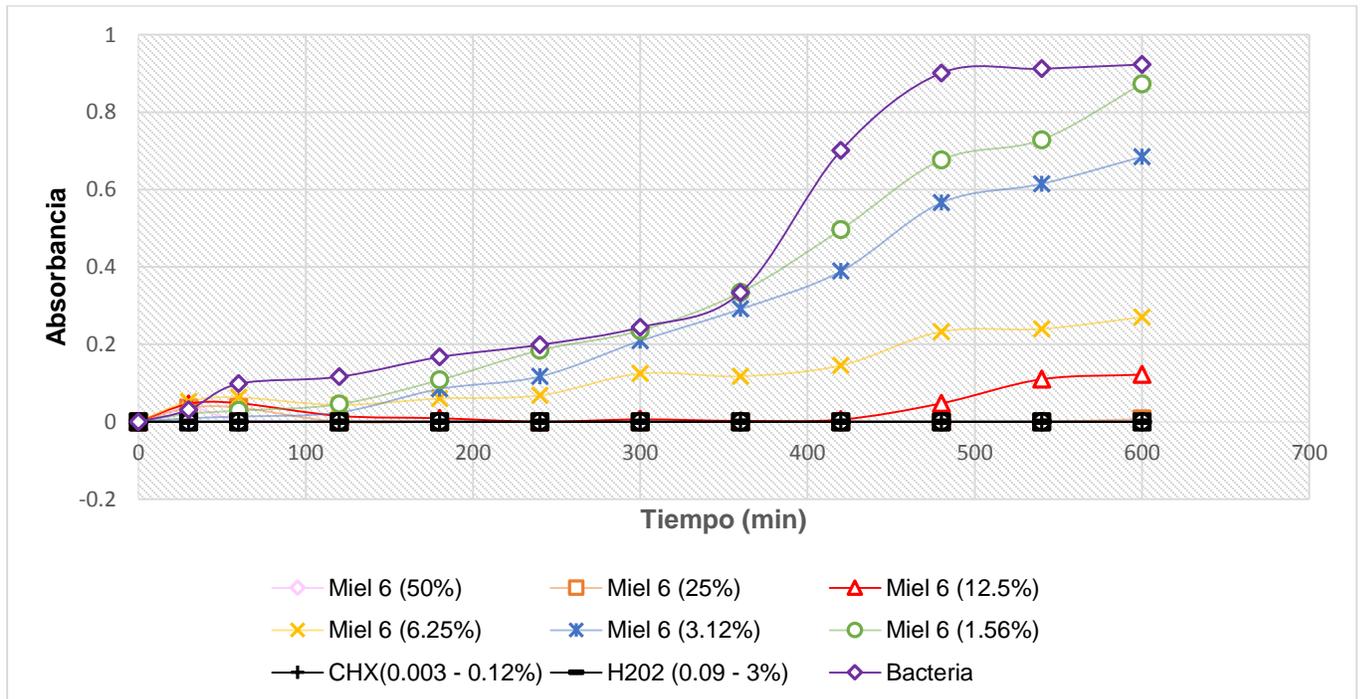
**Gráfica 3.** Inhibición de la bacteria *Staphylococcus aureus* frente a la miel 4 a diferentes concentraciones.



**Gráfica 4.** Inhibición de la bacteria *Staphylococcus aureus* frente a la miel 5 a diferentes concentraciones.



**Gráfica 5.** Inhibición de la bacteria *Staphylococcus aureus* frente a la miel 6 a diferentes concentraciones.



El efecto antimicrobiano de las mieles 2, 4, 5 y 6 frente al crecimiento de la bacteria *Streptococcus mutans*, se observa en las Gráficas 6-9, donde hubo un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de dicha bacteria a las concentraciones de 50, 25, 12.5 y 6.25 % (p/v). En la última hora se puede apreciar que empieza a crecer la bacteria, teniendo una absorbancia en un rango de 0.1 a 0.2 para las mieles 2 y 4, y un rango de absorbancia entre 0.03 y 0.24 para las mieles 5 y 6.

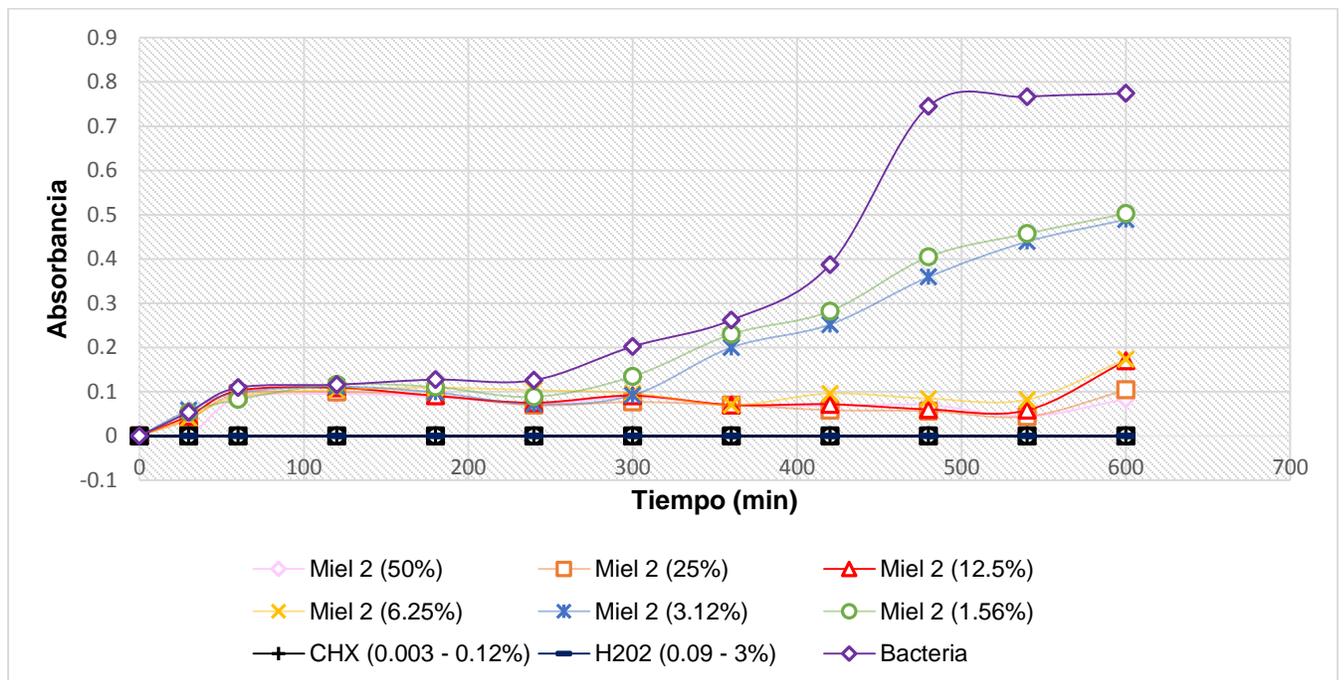
En las Gráficas 6-9 al analizar la actividad inhibitoria de las mieles 2, 4, 5 y 6 a las concentraciones de 3.12 y 1.56 % (p/v) se puede apreciar que hay crecimiento bacteriano, sin embargo, si hay inhibición de la bacteria ya que las curvas se mantienen por debajo del crecimiento de la bacteria *Streptococcus mutans* sin tratamiento durante todo el experimento.

En cuanto a la actividad de la miel 7 sobre el crecimiento de la bacteria *Streptococcus mutans* se observa en la Gráfica 10 que a la concentración de 50 % (p/v) no hay crecimiento de la bacteria, no obstante desde la concentración de 25 % (p/v) hasta llegar a la concentración de 1.56 % (p/v) hay un considerable crecimiento de la bacteria, sin embargo si hay inhibición ya que las concentraciones nunca sobrepasan el crecimiento de la bacteria *Streptococcus mutans* sin tratamiento.

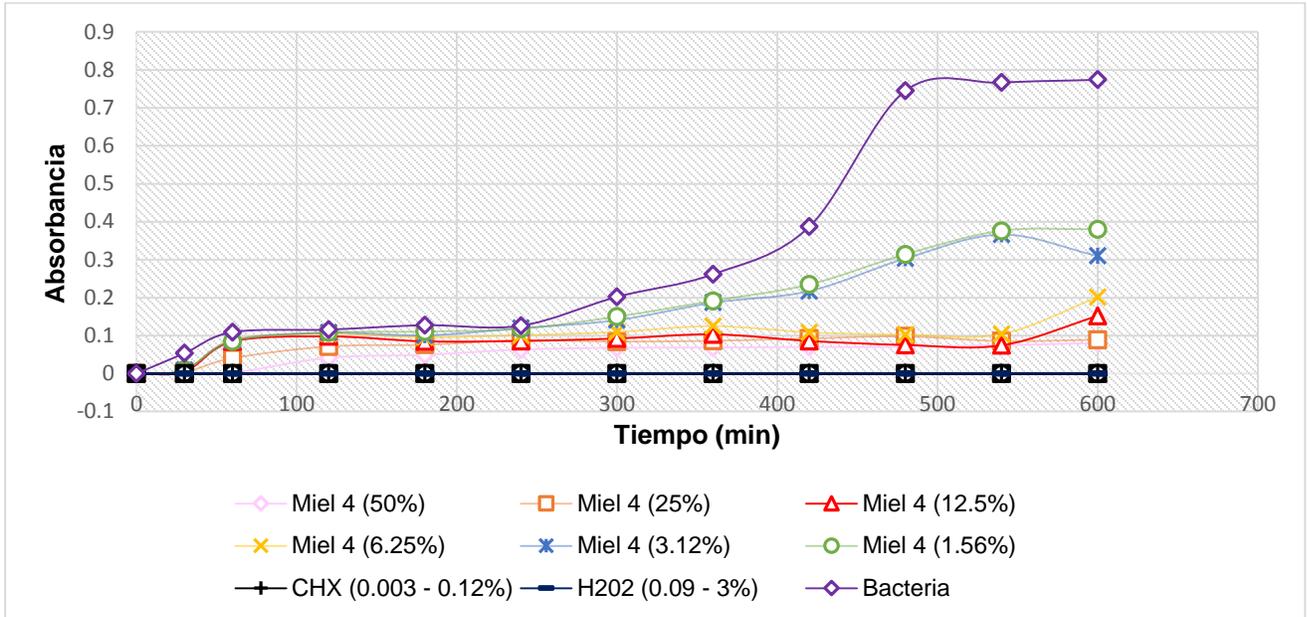
Comparando dichos resultados con lo que dicen los autores Nassar, Li y Gregory [84] acerca del efecto de la miel sobre el crecimiento de *Streptococcus mutans*, donde ellos realizaron una curva de crecimiento de la bacteria frente a una miel natural comprada en una tienda de comestibles en Arabia Saudita, se arrojan resultados en los que la bacteria presenta una inhibición hasta concentraciones de 12.5% de miel, sin embargo a concentraciones menores presenta crecimiento bacteriano.

Dicho esto se puede afirmar que las mieles de Cuetzalan, Puebla tienen un potente efecto antibacteriano ya que la bacteria se mantuvo inhibida con todas las concentraciones de las mieles probadas. Sin embargo como ya se había mencionado hay mieles más eficaces que otras, en este caso las mieles más potentes fueron las mieles 4, 5 y 6 debido a que inhibieron mayormente el crecimiento de la bacteria a concentraciones menores de miel. La miel menos potente fue la 7 ya que esta permitió el crecimiento de la bacteria en los tiempos finales de ensayo.

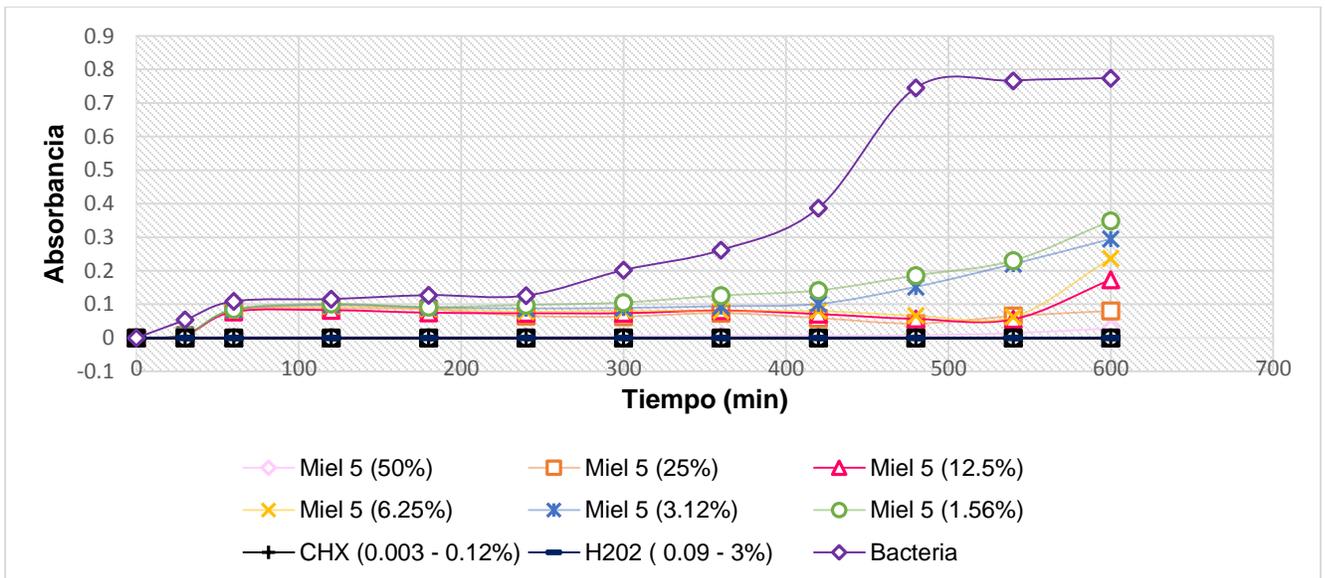
**Gráfica 6.** Inhibición de la bacteria *Streptococcus mutans* frente a la miel 2 a diferentes concentraciones.



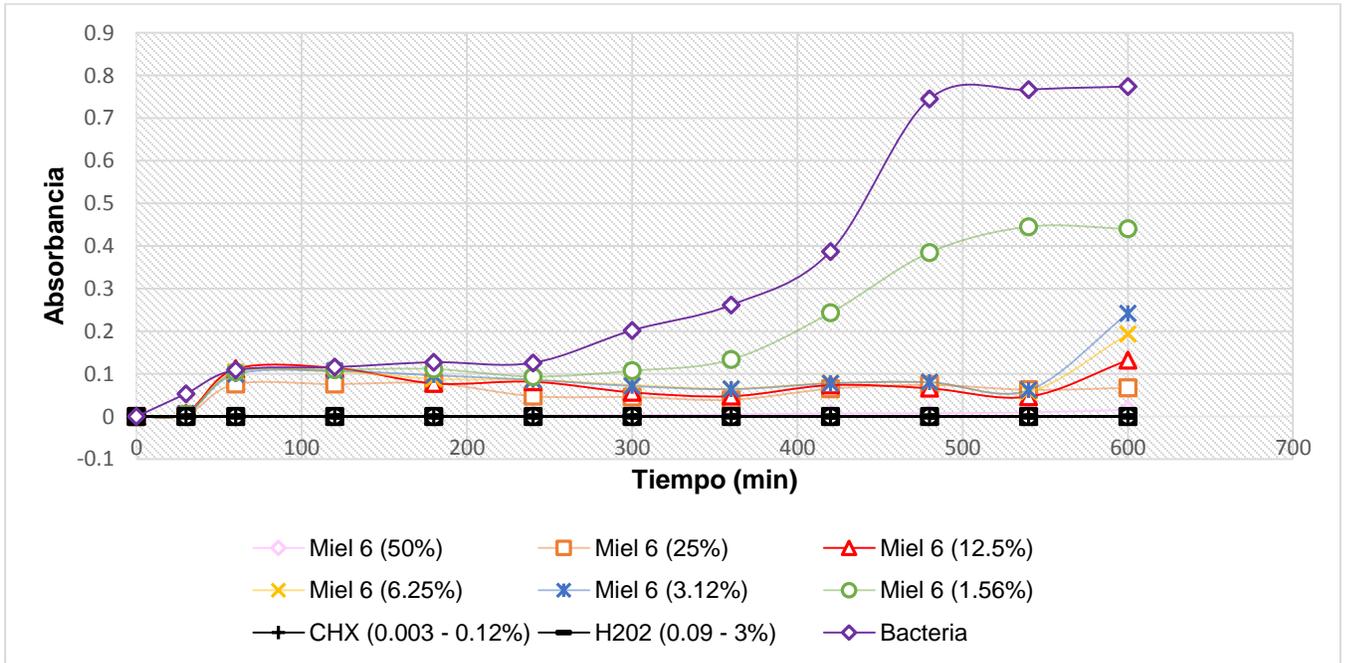
**Gráfica 7.** Inhibición de la bacteria *Streptococcus mutans* frente a la miel 4 a diferentes concentraciones.



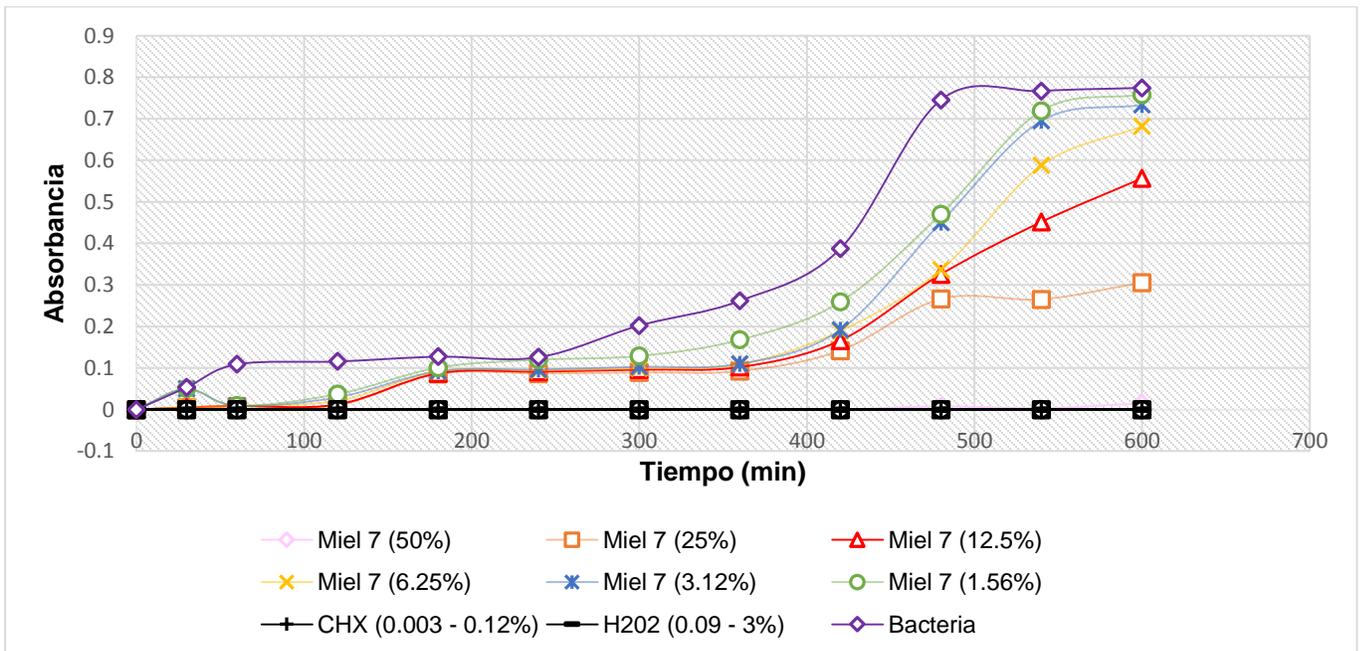
**Gráfica 8.** Inhibición de la bacteria *Streptococcus mutans* frente a la miel 5 a diferentes concentraciones.



**Gráfica 9.** Inhibición de la bacteria *Streptococcus mutans* frente a la miel 6 a diferentes concentraciones.



**Gráfica 10.** Inhibición de la bacteria *Streptococcus mutans* frente a la miel 7 a diferentes concentraciones.



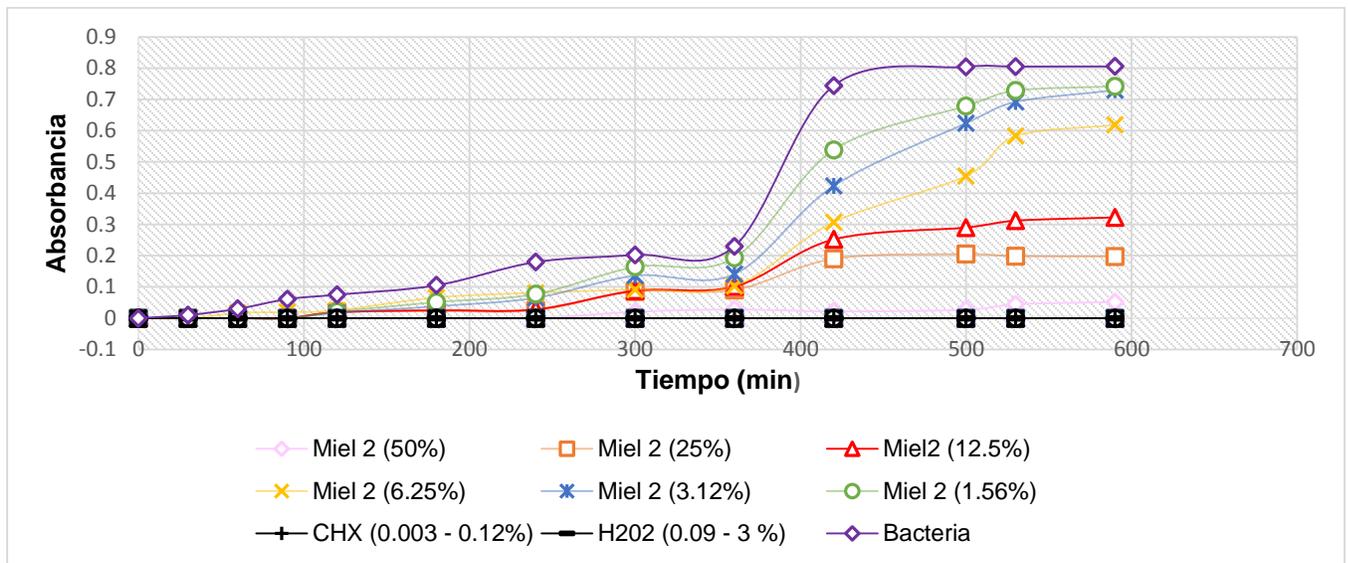
En las Gráficas 11-13 analizando la actividad antibacteriana de las mieles 2, 3 y 4 con respecto al crecimiento de la bacteria *Streptococcus pyogenes* presentan una inhibición consecutiva de la bacteria a las concentraciones de miel de 25, 12.5, 6.25, 3.12 y 1.56 % (p/v), es decir que a mayor concentración de las mieles hay mayor inhibición del crecimiento de la bacteria.

La miel más potente frente al crecimiento de la bacteria *Streptococcus pyogenes* es la miel 4, ya que fueron las concentraciones de dicha miel comparadas con las demás, la que tuvieron un mayor efecto antibacteriano, debido a que hay una mayor inhibición. En la literatura hay estudios que demuestran la eficacia de la miel para inhibir el crecimiento bacteriano tal como lo demuestra Mshelia [85] en su artículo donde afirma que la miel tiene actividad inhibitoria y bactericida frente a la bacteria *Streptococcus pyogenes* hasta concentraciones de 25 % de miel, que fueron las estudiadas en la metodología del artículo mencionado.

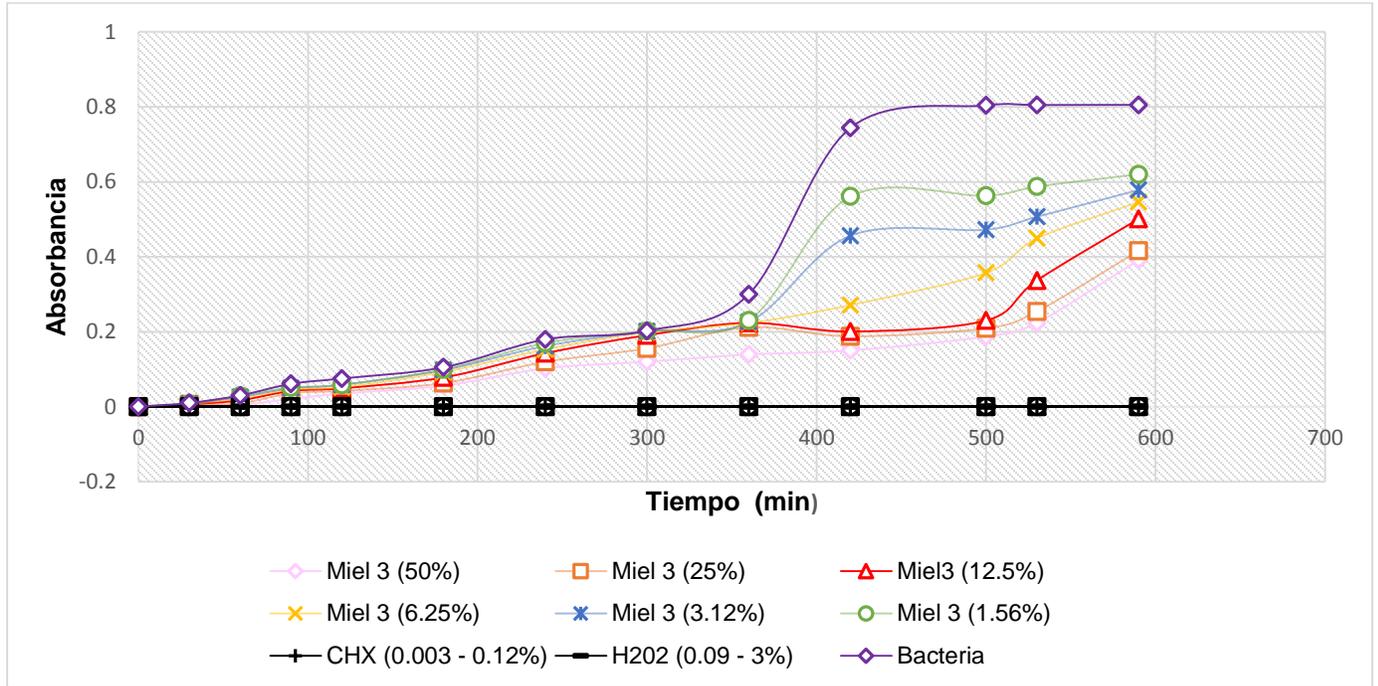
La característica que determina si una miel es más potente que otra, es su composición y esta depende de los tipos de flores visitadas por las abejas. El color, sabor y la constitución de la miel, las condiciones geográficas en las cuales se produjo esta, la variedad de las abejas que la produjo y el tipo de flores que han proporcionado el néctar [2]. Algunos ejemplos de lo señalado, son las investigaciones realizadas por Molan y Rhodes, quienes demostraron que la miel de Manuka de Nueva Zelanda, que proviene del arbusto *Leptospermum scoparium*, tiene una gran actividad antibacteriana que no solo se debe al peróxido de hidrógeno presente, sino que además, al componente llamado metilglioxal, un potente inhibidor del crecimiento bacteriano [86]. Por su parte, la miel de Tualang de Malasia presenta mejores resultados que su control con respecto a la reducción del crecimiento bacteriano de

*Pseudomonas aeruginosa* en herida de quemadura en ratas [40]. Por otra parte Ahmed y Othman [87], compararon algunas propiedades y características bioquímicas con la miel de Manuka y observaron que sus diferencias incluyen compuestos fenólicos, flavonoides y HMF másaltos, lo que le confiere mayor eficacia que la miel de Manuka contra algunas cepas de bacterias Gram negativas.

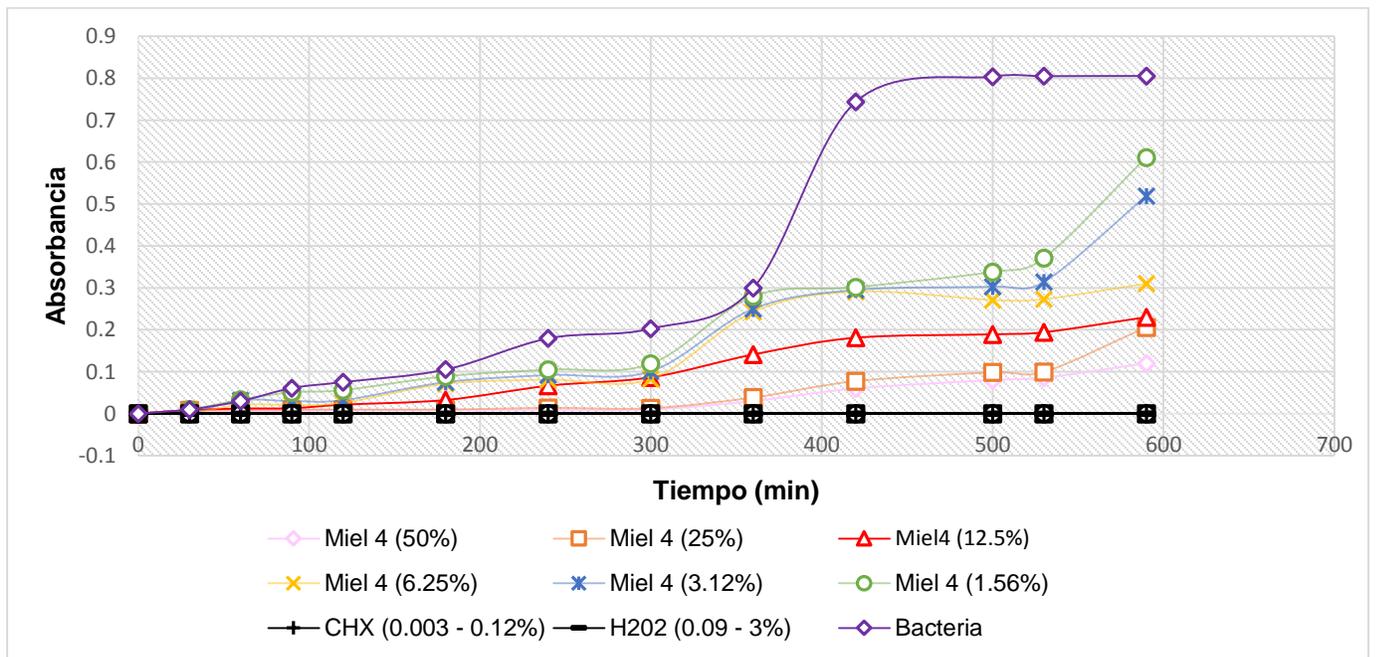
**Gráfica 11.** Inhibición de la bacteria *Streptococcus pyogenes* frente a la miel 2 a diferentes concentraciones.



**Gráfica 12.** Inhibición de la bacteria *Streptococcus pyogenes* frente a la miel 3 a diferentes concentraciones.



**Gráfica 13.** Inhibición de la bacteria *Streptococcus pyogenes* frente a la miel 4 a diferentes concentraciones.



## 6. CONCLUSIONES

- Las diez mieles recolectadas en Cuetzalan, Puebla producidas por la abeja *Scaptotrigona mexicana* tienen actividad antibacteriana en un rango de concentraciones de 3.125 a 50 % para el caso de las bacterias Gram positivas *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Streptococcus mutans* (ATCC 10449) y *Streptococcus pyogenes* (SIN CLAVE, FAC. MEDICINA) y en una concentración de 50% para las bacterias Gram negativas *Escherichia coli* enteropatógena (95217) y *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028).
- La bacteria más sensible a la actividad antibacteriana de las diez mieles fue la bacteria *Streptococcus mutans* (ATCC 104 49), al tener mayor inhibición y muerte a concentraciones de 3.125 %. La menos sensible fue la bacteria *Escherichia coli* (108412), la cual no fue inhibida por ninguna de las diez mieles.
- En los ensayos de MIC y MBC la miel más potente fue la miel 6, presentando actividad antibacteriana en un rango de concentraciones de 3.125 a 50 %, siendo esta la que presentó los MIC y MBC más bajos en todas las bacterias a excepción de *Escherichia coli*.
- En la determinación de la actividad antimicrobiana de las mieles mediante los ensayos de curvas de crecimiento, se concluyó que las mieles que

tienen mayor potencia y efecto inhibitorio para la bacteria *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) fue la miel 5, para la bacteria *Streptococcus mutans* (ATCC 10449) fueron las mieles 5 y 6, y finalmente, para la bacteria *Streptococcus pyogenes* (SIN CLAVE, FAC. MEDICINA) fue la miel 4.

## 7. PERSPECTIVAS

- Realizar curvas de tiempo de muerte para la evaluación de las mieles producidas por la abeja *Scaptotrigona mexicana* contra bacterias Gram positivas y Gram negativas.
- Determinar los componentes químicos que le da actividad antimicrobiana a las mieles producidas por la abeja *Scaptotrigona mexicana* en Cuetzalan, Puebla

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- [1] A. Ulloa, P. M. Mondragón, R. Rodríguez, J. A. Resendíz, y P. Rosas, “La miel de abeja y su importancia”, *Fuente*, vol. 2, núm. 4, pp. 11–18, 2010.
- [2] N. Arnold, R. Zepeda, M. Vásquez, y M. Aldasoro, “Las abejas sin aguijón y su cultivo en Oaxaca , México con catálogo de especies”, 2018. [En línea]. Disponible en: <http://bioteca.biodiversidad.gob.mx/janium/Documentos/14197.pdf>.
- [3] N. Arnold, R. Ayala, J. Mérida, P. Sagot, M. Aldasoro, y R. Vandame, “Revista Mexicana de Biodiversidad para los estados de Chiapas y Oaxaca , México”, *Rev. Mex. Biodivers.*, vol. 89, pp. 651–665, 2018.
- [4] C. D. Michener, *The Bees of the World*, Second. 2007.
- [5] K. Aidoo, R. Combey, A. Karikari, y P. Kwamong, “Stingless bees: importance, management and utilisation. A training manual for stingless beekeeping”, *Social Insects*, 2010. [En línea]. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/235721963\\_Stingless\\_Bees\\_Importance\\_Management\\_and\\_Utilisation\\_ATraining\\_Manual\\_for\\_Stingless\\_Bee\\_Keeping](https://www.researchgate.net/publication/235721963_Stingless_Bees_Importance_Management_and_Utilisation_ATraining_Manual_for_Stingless_Bee_Keeping).
- [6] P. Vit, R. M. Silvia, y D. Roubik, *Pot-Honey: a legacy of stingless bees*, 1a ed. Springer-Verlag New York, 2013.
- [7] K. Hartfelder *et al.*, “Physiological and genetic mechanisms underlying caste development, reproduction and division of labor in stingless bees”, *Apidologie*, vol. 37, núm. 1, pp. 144–163, 2006.
- [8] P. H. Kwakman, A. A. Te Velde, L. De Boer, D. Speijer, C. M. .

- Vandenbroucke-Grauls, y S. A. Zaat, "How honey kills bacteria", *FASEB*, vol. 24, núm. 7, pp. 2576–82, 2010.
- [9] N. Gallai, J. M. Salles, J. Settele, y E. Bernard, "Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline", *Ecol. Econ.*, vol. 68, núm. 3, pp. 810–821, 2009.
- [10] A. M. Klein *et al.*, "Importance of pollinators in changing landscapes for world crops", *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.*, vol. 274, núm. 1608, pp. 303–313, 2007.
- [11] C. Kremen, N. M. Williams, y R. W. Thorp, "Crop pollination from native bees at risk from agricultural intensification", *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 99, núm. 26, pp. 16812–6, 2002.
- [12] C. Kremen *et al.*, "Pollination and other ecosystem services produced by mobile organisms: a conceptual framework for the effects of land-use change", *Ecol. Lett.*, vol. 10, núm. 4, pp. 299–314, 2007.
- [13] F. G. Barth, M. Hrncir, y S. Jarau, "Signals and cues in the recruitment behavior of stingless bees (Meliponini)", *J. Comp. Physiol. A Neuroethol. Sensory, Neural, Behav. Physiol.*, vol. 194, núm. 4, pp. 313–27, 2008.
- [14] E. J. Slaa, A. J. M. Tack, y M. J. Sommeijer, "The effect of intrinsic and extrinsic factors on flower constancy in stingless bees", *Apidologie*, vol. 34, núm. 5, pp. 457–468, 2003.
- [15] J. B. Berry, "The complex responses of social stingless bees (Apidae: Meliponini) to tropical deforestation", *For. Ecol. Manage.*, vol. 258, núm. 9, pp. 1830–1837, 2009.
- [16] O. Cauich, J. J. Quezada-euán, J. O. Macias, V. Reyes, S. Medina, y V. Parra, "Behavior and pollination efficiency of *nannotrigona perilampoides*

- (Hymenoptera: Meliponini) on greenhouse tomatoes (*Lycopersicon esculentum*) in subtropical México”, *J. Econ. Entomol.*, vol. 97, núm. 2, pp. 475–481, 2004.
- [17] C. Schencke, B. Vásquez, C. Sandoval, y M. del Sol, “El rol de la miel en los procesos morfofisiológicos de reparación de heridas”, *Int. J. Morphol.*, vol. 34, núm. 1, pp. 385–395, 2016.
- [18] R. Ebermann y I. Elmadfa, *Lehrbuch lebensmittelchemie und ernährung*. 2011.
- [19] J. Schormüller, *Lehrbuch der Lebensmittelchemie*. 1974.
- [20] U. Siedentopp, “La miel: producto alimenticio y medicinal eficaz contra la inflamación, la tos y la ronquera”, *Acupuntura*, vol. 4, núm. 1, pp. 48–51, 2010.
- [21] N. S. Al-Waili, K. Salom, G. Butler, y A. A. Al Ghamdi, “Honey and microbial infections: A review supporting the use of honey for microbial control”, *J. Med. Food*, vol. 14, núm. 10, pp. 1079–96, 2011.
- [22] M. K. Tan, D. S. Hasan Adli, M. A. Tumiran, M. A. Abdulla, y K. M. Yusoff, “The efficacy of Gelam honey dressing towards excisional wound healing”, *Evidence-based Complement. Altern. Med.*, vol. 2012, núm. 2, pp. 1–3, 2012.
- [23] A. Zbucnea, “Up-to-date use of honey for burns treatment”, *Ann. Burns Fire Disasters*, vol. 27, núm. 1, pp. 22–30, 2014.
- [24] A. B. Jull, N. Cullum, J. C. Dumville, M. J. Westby, S. Deshpande, y N. Walker, “Honey as a topical treatment for wounds”, *Cochrane Database Syst. Rev.*, vol. 6, núm. 3, pp. 73–96, 2015.

- [25] G. Godebo, G. Kibru, y H. Tassew, "Multidrug-resistant bacterial isolates in infected wounds at Jimma University Specialized Hospital, Ethiopia", *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.*, vol. 12, núm. 17, pp. 2–6, 2013.
- [26] N. A. Melake, N. A. Eissa, T. F. Keshk, y A. S. Sleem, "Prevalence of multidrug-resistant bacteria isolated from patients with burn infection", *Menoufia Med. J.*, vol. 28, núm. 3, pp. 677–684, 2015.
- [27] S. S. Gupta, O. Singh, P. S. Bhagel, S. Moses, S. Shukla, y R. K. Mathur, "Honey dressing versus silver sulfadiazene dressing for wound healing in burn patients: a retrospective study", *J. Cutan. Aesthet. Surg.*, vol. 4, núm. 3, pp. 183–187, 2011.
- [28] V. S. Mujalde, A. Jalaj, y P. Raj, "To assess the efficacy of honey in comparison with 1 % silver sulfadiazine cream as a burn wound dressing in superficial and partial thickness of burns", *Sch. J. Appl. Med. Sci.*, vol. 2, núm. 1, pp. 193–196, 2014.
- [29] L. Suguna, G. Chandrakasan, U. Ramamoorthy, y K. T. Joseph, "Influence of honey on biochemical and biophysical parameters of wounds in rats", *J. Clin. Biochem. Nutr.*, vol. 14, núm. 2, pp. 91–99, 1993.
- [30] T. Velnar, T. Bailey, y V. Smrkolj, "The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms", *J. Int. Med. Res.*, vol. 37, núm. 5, pp. 1528–42, 2009.
- [31] P. C. Molan, "The evidence and the rationale for the use of honey as a wound dressing", *Wound Pract. Res.*, vol. 19, núm. 4, pp. 204–20, 2011.
- [32] R. Yaghoobi, A. Kazerouni, y O. Kazerouni, "Evidence for clinical use of honey in wound healing as an anti-bacterial, anti-inflammatory anti-oxidant

and anti-viral agent: A review”, *Jundishapur J. Nat. Pharm. Prod.*, vol. 8, núm. 3, pp. 100–104, 2013.

- [33] A. Oryan, E. Alemzadeh, y A. Moshiri, “Biological properties and therapeutic activities of honey in wound healing: a narrative review and meta-analysis”, *J. Tissue Viability*, vol. 25, núm. 2, pp. 98–118, 2016.
- [34] H. Estrada, M. Del Mar, C. Chaves, y M. L. Arias, “Evaluación de la actividad antimicrobiana de la miel de abeja contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Listeria monocytogenes* y *Aspergillus niger*. Evaluación de su carga mi”, *Arch. Latinoam. Nutr.*, vol. 55, núm. 2, pp. 167–171, 2005.
- [35] K. Lay-flurrie, “Honey in wound care: effects, clinical application and patient benefit.”, *Br. J. Nurs.*, vol. 17, núm. 11, pp. 32–6, 2008.
- [36] E. K. Nishio *et al.*, “Antibacterial synergic effect of honey from two stingless bees: *Scaptotrigona bipunctata* Lepeletier, 1836, and *S. postica* Latreille, 1807”, *Sci. Rep.*, vol. 6, núm. 21641, pp. 1–6, 2016.
- [37] T. P. Cushnie y A. J. Lamb, “Antimicrobial activity of flavonoids”, *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 26, núm. 5, pp. 343–56, 2005.
- [38] P. Molan, “Why honey is effective as a medicine: 2. The scientific explanation of its effects”, *Bee World*, vol. 82, núm. 1, pp. 22–40, 2001.
- [39] M. Subrahmanyam, “Topical application of honey for burn wound treatment - an overview.”, *Ann. Burns Fire Disasters*, vol. 20, núm. 3, pp. 137–9, 2007.
- [40] Y. T. Khoo, A. S. Halim, K. K. Singh, y N. Mohamad, “Wound contraction effects and antibacterial properties of Tualang honey on full-thickness burn

- wounds in rats in comparison to hydrofibre.”, *BMC Complement. Altern. Med.*, vol. 10, núm. 48, pp. 1–8, 2010.
- [41] R. E. Jenkins y R. Cooper, “Synergy between oxacillin and manuka honey sensitizes methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to oxacillin”, *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 67, núm. 6, pp. 1405–7, 2012.
- [42] P. Müller *et al.*, “Synergism between medihoney and rifampicin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)”, *PLoS One*, vol. 8, núm. 2, pp. 1–8, 2013.
- [43] G. M. Eliopoulos y C. T. Eliopoulos, “Antibiotic combinations: should they be tested?”, *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 1, núm. 2, pp. 139–56, 1988.
- [44] G. Ulrich, D. Panek, H. Zeitler, H. Vetter, y H. Wagner, “Drug development from natural products: exploiting synergistic effects”, *Indian J. Exp. Biol.*, vol. 48, núm. 3, pp. 208–19, 2010.
- [45] A. Tonks, R. A. Cooper, A. J. Price, P. C. Molan, y K. P. Jones, “Stimulation of TNF- $\alpha$  release in monocytes by honey”, *Cytokine*, vol. 14, núm. 4, pp. 240–242, 2001.
- [46] A. Meda, C. E. Lamien, M. Romito, J. Millogo, y O. G. Nacoulma, “Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in Burkina Fasan honey, as well as their radical scavenging activity”, *Food Chem.*, vol. 91, núm. 3, pp. 571–577, 2005.
- [47] M. P. Singh *et al.*, “Honey as complementary medicine - A review”, *Int. J. Pharma Bio Sci.*, vol. 3, núm. 2, pp. 12–31, 2012.
- [48] Z. Jubri, N. Abdul, y G. Aan, “Manuka honey protects middle-aged rats from oxidative damage”, *Clinics*, vol. 68, núm. 11, pp. 1446–1454, 2013.

- [49] N. Pourreza, "Phenolic compounds as potential antioxidant", *Jundishapur J. Nat. Pharm. Prod.*, vol. 8, núm. 4, pp. 149–50, 2013.
- [50] G. Šarić, K. Marković, D. Vukicevic, E. Lez, M. Hruskar, y N. Vahčić, "Changes of antioxidant activity in honey after heat treatment", *Czech J. Food Sci.*, vol. 31, núm. 6, pp. 601–606, 2013.
- [51] L. Vandamme, A. Heyneman, H. Hoeksema, J. Verbelen, y S. Monstrey, "Honey in modern wound care: a systematic review", *Burns*, vol. 39, núm. 8, pp. 1514–25, 2013.
- [52] N. Gheldof, X. H. Wang, y N. J. Engeseth, "Identification and quantification of antioxidant components of honeys from various floral sources", *J. Agric. Food Chem.*, vol. 50, núm. 21, pp. 5870–7, 2002.
- [53] M. D. Hadagali y L. S. Chua, "The anti-inflammatory and wound healing properties of honey", *Eur. Food Res. Technol.*, vol. 239, núm. 6, pp. 1003–1014, 2014.
- [54] P. Molan y T. Rhodes, "Honey: A biologic wound dressing", *Wounds*, vol. 27, núm. 6, pp. 141–51, 2015.
- [55] M. Subrahmanyam, A. G. Sahapure, N. S. Nagane, V. R. Bhagwat, y J. V. Ganu, "Effects of topical application of honey on burn wound healing.", *Ann. Burn. Fires Disasters*, vol. 14, núm. 3, pp. 143–145, 2001.
- [56] M. Calderon, C. Figueroa, J. Arias, A. Sandoval, y F. Torre, "Combined therapy of Ulmo honey (*Eucryphia cordifolia*) and ascorbic acid to treat venous ulcers", *Rev. Lat. Am. Enfermagem*, vol. 23, núm. 2, pp. 259–66, 2015.
- [57] C. Rocha, N. D. Reynolds, y M. P. Simons, "Resistencia emergente a los

antibióticos: una amenaza global y un problema crítico en el cuidado de la salud”, *Rev. Peru. Med. Exp. Salud Publica*, vol. 32, núm. 1, pp. 139–145, 2015.

[58] M. J. C. Salles, J. Zurita, C. Mejía, y M. V. Villegas, “Resistant Gram-negative infections in the outpatient setting in Latin America”, *Epidemiol. Infect.*, vol. 141, núm. 12, pp. 2459–2472, 2013.

[59] Organización Mundial de la Salud, “Datos recientes revelan los altos niveles de resistencia a los antibióticos en todo el mundo”, *Comunicado De Prensa*, 2018. [En línea]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/detail/29-01-2018-high-levels-of-antibiotic-resistance-found-worldwide-new-data-shows>.

[60] G. Kahl, “Escherichia coli ( E. coli )”, en *The dictionary of genomics, transcriptomics and proteomics*, 2015.

[61] A. Cravioto, F. Trujillo, L. León, J. Hernández, y C. Eslava, “Infecciones por Escherichia coli enteropatógena”, *Gac. Med. Mex.*, vol. 132, núm. 6, pp. 611–614, 1996.

[62] S. M. Pires *et al.*, “Aetiology-specific estimates of the global and regional incidence and mortality of diarrhoeal diseases commonly transmitted through food”, *PLoS One*, vol. 10, núm. 12, pp. 1–16, 2015.

[63] A. E. Farfán, S. C. Ariza, F. A. Vargas, y L. V. Vargas, “Mecanismos de virulencia de Escherichia coli enteropatógena”, *Rev. Chil. infectología*, vol. 33, núm. 4, pp. 438–450, 2016.

[64] L. R. Trabulsi, R. Keller, y T. A. Gomes, “Typical and atypical enteropathogenic Escherichia coli”, *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 8, núm. 5, pp.

508–513, 2002.

- [65] J. A. García, J. Paniagua, R. Pelayo, A. Isibasi, y J. Kumate, “Factores de virulencia de *Salmonella typhi* en relación al desarrollo de nuevas vacunas.”, *Salud Publica de Mexico*, 1992. .
- [66] T. Junod, J. López, y P. Gädicke, “Estudio de susceptibilidad antimicrobiana de *Salmonella enterica* en muestras de origen animal y alimentario”, *Rev. Med. Chil.*, vol. 141, núm. 3, 2013.
- [67] E. Cota, L. Hurtado, E. Pérez, y L. Alcantara, “Resistencia a antibióticos de cepas bacterianas aisladas de animales destinados al consumo humano”, *Rev. Iberoam. Ciencias*, vol. 1, núm. 1, pp. 75–83, 2014.
- [68] E. Cervantes, R. García, y P. M. Salazar, “Características generales del *Staphylococcus aureus*”, *Rev. Latinoam. Patol. Clínica y Med. Lab.*, vol. 61, núm. 1, pp. 28–40, 2014.
- [69] J. J. Camarena y R. Sánchez, “Infección por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina”, *Control Calidad SEIMC*, 1999. [En línea]. Disponible en:  
<https://seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/bacteriologia/sarm.pdf>  
.
- [70] J. C. Ojeda, E. Oviedo, y L. A. Salas, “*Streptococcus mutans* y caries dental”, *Rev. CES Odontol.*, vol. 26, núm. 1, pp. 44–56, 2013.
- [71] S. Hamada y H. D. Slade, “Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*”, *Microbiol. Rev.*, vol. 44, núm. 2, pp. 331–384, 1980.
- [72] M. Escribano, P. Matesanz, y A. Bascones, “Pasado, presente y futuro de la microbiología de la periodontitis”, *Av. en Periodoncia e Implantol. Oral*, vol.

17, núm. 2, pp. 79–87, 2005.

- [73] G. Milicich, “Caries: una perspectiva de la enfermedad oral que nos esforzamos por manejar”, *Mínima Interv. en Odontol.*, vol. 1, núm. 1, pp. 25–32, 2008.
- [74] C. D. Nadell, J. B. Xavier, S. A. Levin, y K. R. Foster, “The evolution of quorum sensing in bacterial biofilms”, *PLOS Biol.*, vol. 6, núm. 1, p. 14, 2008.
- [75] C. J. Nazar, “Biofilms bacterianos”, *Rev. Otorrinolaringol. y cirugía cabeza y cuello*, vol. 67, núm. 1, pp. 61–72, 2007.
- [76] B. Aracil y A. Ignacio, “Streptococcus pyogenes resistente a los macrólidos”, *Control calidad SEIMC*, 2001. [En línea]. Disponible en: <https://www.seimc.org/contenidos/ccs/revisionestematicas/bacteriologia/fenotm.pdf>.
- [77] Organización Mundial de la Salud, “Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014”, *Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014*, 2016. [En línea]. Disponible en: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>.
- [78] H. Gelband *et al.*, “State of the world ’s antibiotics 2015”, *Center for Disease Dynamics, Economics & Policy 2015*, 2015. [En línea]. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/308721773\\_The\\_State\\_of\\_the\\_World's\\_Antibiotics\\_2015](https://www.researchgate.net/publication/308721773_The_State_of_the_World's_Antibiotics_2015).
- [79] CLSI, “Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 11th ed. CLSI standards M07.”, *Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute*, 2018. .
- [80] G. Horna, M. Silva, W. Vicente, y J. Tamariz, “Concentración mínima

inhibitoria y concentración mínima bactericida de ciprofloxacina en bacterias uropatógenas aisladas en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas.”, *Rev. Medica Hered.*, vol. 16, núm. 1, pp. 39–45, 2005.

- [81] C. Berríos y R. Ilabaca, “Bacterias Gram Negativas”, en *Manual de Microbiología*, UC., Chile, 2019, p. 260.
- [82] L. G. Zamora y M. L. Arias, “Calidad microbiológica y actividad antimicrobiana de la miel de abejas sin aguijón”, *Rev. Biomédica*, vol. 22, núm. 2, pp. 59–66, 2011.
- [83] PROBIOTEK, “Resazurin Cell Viability Assay”, 2011. [En línea]. Disponible en: <https://www.probiotek.com/productos/reactivos/colorantes/resazurin-cell-viability-assay-kit/>.
- [84] H. M. Nassar, M. Li, y R. L. Gregory, “Effect of honey on *Streptococcus mutans* growth and biofilm formation”, *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 78, núm. 2, pp. 536–40, 2012.
- [85] B. M. Mshelia, “The Antibacterial Activity of Honey and Lemon Juice against *Streptococcus pneumoniae* and *Streptococcus pyogenes* Isolates from Respiratory Tract Infections”, *Adv. Biotechnol. Microbiol.*, vol. 1, núm. 3, pp. 581–3226, 2018.
- [86] J. Lu *et al.*, “The effect of New Zealand Kanuka, Manuka and clover honeys on bacterial growth dynamics and cellular morphology varies according to the species”, *PLoS One*, vol. 8, núm. 2, pp. 2–12, 2013.
- [87] S. Ahmed y N. Othman, “Review of the medicinal effects of tualang honey and a comparison with Manuka honey”, *Malaysian Journal of Medical Sciences*. 2013.

