



UNIVERSIDAD NACIONAL PEDRO RUIZ GALLO

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



DEPARTAMENTO ACADÉMICO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA

TESIS

**Efecto inhibitorio *in vitro* de la miel de abeja sobre *Staphylococcus aureus*
y *Escherichia coli* aisladas de heridas superficiales**

PRESENTADA POR:

Lucy del Milagro Vélez Llontop

Jorhinio Zambrano Calderón

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE LICENCIADO EN BIOLOGÍA,
MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA**

**Lambayeque-Perú
Enero – 2018**

**Efecto inhibitorio *in vitro* de la miel de abeja sobre *Staphylococcus aureus*
y *Escherichia coli* aisladas de heridas superficiales.**

TESIS

**PARA OPTAR EL TITULO DE LICENCIADO EN BIOLOGÍA,
MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA**

Presentada por:

Bach. Lucy del Milagro Vélez Llontop

Bach. Jorhinio Zambrano Calderón

Patrocinadora:

Dra. Martha Vergara Espinoza

Lambayeque-Perú

Enero - 2018

**EFFECTO INHIBITORIO *IN VITRO* DE LA MIEL DE ABEJA SOBRE
Staphylococcus aureus Y *Escherichia coli* AISLADAS DE HERIDAS
SUPERFICIALES**

T E S I S

Presentada a la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo como
requisito parcial para optar el Título profesional de:
Licenciado en Biología Microbiología Parasitología

Aprobada por:

.....
Dra. Martha Vergara Espinoza
Asesora

.....
Lic. Mario Moreno Mantilla
Presidente de Jurado

.....
Dra. Socorro Vásquez del Castillo
Secretaria de Jurado

.....
Lic. Julio Silva Estela
Vocal de Jurado

DEDICATORIA

A:

DIOS:

Por hacer este sueño realidad, guiarme e iluminarme en mi camino brindándome las fuerzas para salir adelante y lograr realizar mis metas trazadas.

MI FAMILIA:

A mis padres por el apoyo incondicional que me dieron en los momentos más difíciles que pasé y por el apoyo en mi educación.

Hijos:

A mis hijos Bianca y Fernando por ser la fortaleza que necesito para llegar hasta donde he llegado, son impresionantes, su amor es para mí invaluable; su ayuda fue fundamental para la culminación de mi tesis.

Lucy del Milagro Vélez Llontop

A:

A mis padres, quienes han sido siempre los que me han apoyado en las decisiones que he tomado y por el amor incondicional que me han brindado, permitiendo así cumplir mis metas; además por los valores que siempre me inculcaron para ser una persona íntegra y un buen profesional.

A mis amigos, por las hermosas cosas bonitas que hemos y seguiremos pasando durante toda esta vida que tenemos en unión y amor.

A mis maestros, por el afecto y aprecio que les tengo, son un modelo a seguir, por los diferentes logros que han tenido y ser unos maravillosos profesionales.

A mi hermano Ricardo que desde el cielo me ilumina, y siempre me brindó su apoyo en todo momento.

A mis hijas Audry y Amy, las ayudas que me han brindado son indispensables para mí, son el motivo y mi motivación; las amo

Jorhinio Zambrano Calderón

AGRADECIMIENTO

Primero y antes de nada dar gracias a Dios por estar con nosotros en cada paso que damos, por fortalecer nuestro corazón e iluminar nuestra mente y por haber puesto en nuestro camino a aquellas personas que han sido nuestro soporte y compañía durante todo el período de estudios.

A la asesora, Martha Vergara Espinoza, por la ayuda y conocimientos prestados hacia nosotros.

A nuestros profesores quienes brindaron sus conocimientos para ser profesionales pero más que todo, por ser grandes seres humanos y por compartir con nosotros el amor a su carrera.

Gracias a nuestros compañeros que nos apoyaron y nos permitieron entrar en su vida durante los años de estudios.

A nuestra querida Alma mater la Universidad Nacional Pedro Ruíz Gallo y a la Facultad de Ciencias Biológicas, lugar donde se ha desarrollado nuestro pensamiento crítico e intelectual.

Lucy y Jorhinio

RESUMEN

Los objetivos de la investigación fueron: Identificar *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* aisladas de heridas superficiales y determinar el efecto inhibitorio *in vitro* de la miel sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* aisladas de heridas superficiales. Se utilizó miel de abeja del árbol de zapote, miel de abeja del árbol de algarrobo y miel multifloral, procedentes del Distrito de Motupe Departamento Lambayeque. En la identificación bacteriana se siguió la metodología del Manual de Procedimientos Bacteriológicos en Infecciones Intrahospitalarias - Instituto Nacional de Salud –Serie de Normas Técnicas N°28 y para la determinación del efecto inhibitorio *in vitro* de la miel de abeja se aplicó Método modificado de difusión de Kirby Bauer. Se identificó *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* en el 27.27% y 13.64% de heridas superficiales respectivamente. La miel de abeja de algarrobo y de zapote y la miel de abeja multifloral a concentraciones de 50% y 100% tienen efecto inhibitorio *in vitro* sobre *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* aisladas de heridas superficiales, siendo el efecto dependiente del tipo de miel y de la cepa probada y directamente proporcional a la concentración. El efecto inhibitorio *in vitro* de la miel de algarrobo y de la miel de zapote es significativamente mayor que el de la miel multifloral; así mismo es mayor frente a *Staphylococcus aureus* que frente a *Escherichia coli* aisladas de heridas superficiales.

Palabras clave: abeja, miel, efecto inhibitorio, cepa.

ABSTRACT

The objectives of the research were: Identify *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* isolated from superficial wounds and determine the *in vitro* inhibitory effect of honey growth of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* isolated from superficial wounds. Bee honey was used from the zapote tree, bee honey from the carob tree and honey marketed, from the District of Motupe Lambayeque Department. In the bacterial identification the methodology of the Manual of Bacteriological Procedures in Intrahospitalary Infections - National Institute of Health - Series of Technical Standards No. 28 was followed and for the determination of the *in vitro* inhibitory effect of honey was applied modified method of diffusion of Kirby Bauer. *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* were identified in 27.27% and 13.64% of superficial wounds, respectively. Carob and zapote bee honeys and multifloral honey at concentrations of 50% and 100% have an *in vitro* inhibitory effect on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* isolated from superficial wounds, the effect being dependent on the type of honey and the strain tested and directly proportional to the concentration. The *in vitro* inhibitory effect of carob honey and zapote honey is significantly greater than that of multifloral honey; Likewise, it is significantly greater against *Staphylococcus aureus* than against *Escherichia coli* isolated from superficial wounds.

Keywords: bee, honey, Inhibitory effect, Strain.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	3
2.1.	BASES TEÓRICAS	8
2.1.1.	Miel de abeja	9
2.1.2.	Componentes de la miel de abeja	10
2.1.3.	Variedades más representativas de miel de abeja en el Perú.....	10
2.1.4.	Efecto antibacteriano	11
2.1.5.	Efecto farmacológico.....	12
III.	METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACION.....	13
3.1.	UNIDAD DE ANÁLISIS	13
3.2.	POBLACIÓN Y MUESTRA.....	13
3.3.	TIPO DE INVESTIGACIÓN Y DISEÑO DE CONTRASTACIÓN DE HIPÓTESIS	13
3.4.	VARIABLES DE ESTUDIO.....	13
3.4.1.	Variable Independiente:.....	13
3.4.2.	Variable Dependiente:	14
3.5.	PROCEDIMIENTO	14
3.5.1.	Identificación de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i> aisladas de heridas superficiales	14
3.5.2.	Determinación del efecto inhibitorio in vitro de la miel de abeja a diferentes concentraciones sobre el crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i> aisladas de heridas superficiales	17
3.5.3.	Ensayo del efecto inhibitorio de miel de abeja sobre cepas bacterianas (método modificado de difusión de Kirby Bauer en Kinsbruy, 1991 y Sacsquispe y Velásquez, 2002).	19
3.6.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	20
IV.	RESULTADOS.....	21
V.	DISCUSIÓN	31
VI.	CONCLUSIONES.....	35

VII. RECOMENDACIONES	36
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	37
ANEXOS	40
ANEXO 1. PROCESO Y ELABORACIÓN DE LA MIEL DE ABEJA	40
ANEXO 2. IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES AISLADAS DE LAS HERIDAS PURULENTAS.	41
ANEXO 3. ANTIBIOGRAMA Y CMI PARA <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> Y <i>ESCHERICHIA COLI</i> 42	
ANEXO 4. PRUEBA DE SIGNIFICACIÓN DE TUKEY (0.05) DEL EFECTO INHIBITORIO <i>IN VITRO</i> DE MIEL DE ABEJA SOBRE <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> SEGÚN CONCENTRACIÓN Y TIPO DE MIEL	43
ANEXO 5. PRUEBA DE SIGNIFICACIÓN DE TUKEY (0.05) DEL EFECTO INHIBITORIO <i>IN VITRO</i> DE MIEL DE ABEJA SOBRE <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> SEGÚN CONCENTRACIÓN Y CEPA.....	44
ANEXO 6. PRUEBA DE SIGNIFICACIÓN DE TUKEY (0.05) DEL EFECTO INHIBITORIO <i>IN VITRO</i> DE MIEL DE ABEJA SOBRE <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> SEGÚN TIPO DE MIEL Y CEPA.....	46
ANEXO 7. PRUEBA DE SIGNIFICACIÓN DE TUKEY (0.05) DEL EFECTO INHIBITORIO <i>IN VITRO</i> DE MIEL DE ABEJA SOBRE <i>ESCHERICHIA COLI</i> SEGÚN TIPO DE MIEL Y CONCENTRACIÓN.....	47
ANEXO 8. PRUEBA DE SIGNIFICACIÓN DE TUKEY (0.05) DEL EFECTO INHIBITORIO <i>IN VITRO</i> DE MIEL DE ABEJA SOBRE <i>ESCHERICHIA COLI</i> SEGÚN TIPO DE CEPA Y CONCENTRACIÓN. ...	48

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Staphylococcus aureus y Escherichia coli aisladas de heridas superficiales.....	21
Tabla 2. Diámetro de halos de inhibición (mm) del crecimiento de Staphylococcus aureus aislada de heridas superficiales por efecto de miel de abeja de algarrobo a diferentes concentraciones	22
Tabla 3. Diámetro de inhibición (mm) del crecimiento de Staphylococcus aureus aislada de heridas superficiales por efecto de miel de abeja de zapote a diferentes concentraciones	22
Tabla 4. Diámetro de inhibición (mm) del crecimiento de Staphylococcus aureus aislada de heridas superficiales por efecto de miel de abeja de multifloral a diferentes concentraciones	23
Tabla 5. Análisis de Varianza del efecto inhibitorio in vitro de tres tipos de miel de abeja a seis concentraciones sobre seis cepas de Staphylococcus aureus.	24
Tabla 6. Prueba de significación de Tukey (0.05) del efecto inhibitorio in vitro de miel de abeja sobre Staphylococcus aureus según concentraciones de miel	24
Tabla 7. Prueba de significación de Tukey (0.05) del efecto inhibitorio in vitro de miel de abeja sobre Staphylococcus aureus según tipo de miel.	25
Tabla 8. Prueba de significación de Tukey (0.05) del efecto inhibitorio in vitro de miel de abeja sobre Staphylococcus aureus según cepa.....	25
Tabla 9. Diámetro de halos de inhibición en (mm) del crecimiento de Escherichia coli aislada de heridas superficiales por efecto de miel de abeja de algarrobo a diferentes concentraciones.	26
Tabla 10. Diámetros de halos de inhibición (mm) del crecimiento de Escherichia coli aislada de heridas superficiales por efecto de miel de abeja de zapote a diferentes concentraciones	26
Tabla 11. Diámetro de halos de inhibición (mm) del crecimiento de Escherichia coli aislada de heridas superficiales por efecto de miel de abeja de multifloral a diferentes concentraciones.	27
Tabla 12. Análisis de Varianza del efecto inhibitorio in vitro de tres tipos de miel de abeja a seis concentraciones sobre seis cepas de Escherichia coli.	28
Tabla 13. Prueba de significación de Tukey (0.05) del efecto inhibitorio in vitro de miel de abeja sobre Escherichia coli según concentraciones de miel.	29

Tabla 14. Prueba de significación de Tukey (0.05) del efecto inhibitorio in vitro de miel de abeja sobre <i>Escherichia coli</i> según tipo de miel.....	29
Tabla 15. Prueba de significación de Tukey (0.05) del efecto inhibitorio in vitro de miel de abeja sobre <i>Escherichia coli</i> según tipo de cepas.	30

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1.</i> Paciente con herida purulenta.....	14
<i>Figura 2.</i> Aislamiento de bacterias de secreciones de heridas. A. <i>Escherichia coli</i> en agar Mc Conkey y B. <i>Staphylococcus aureus</i> en agar Manitol salado	16
<i>Figura 3.</i> Diluciones de la miel de abeja al 50, 40, 30 ,20 y 10% v/v	18
<i>Figura 4.</i> Discos preparados y esterilizados aptos para ser embebidos en miel	19
<i>Figura 5.</i> <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i> aisladas de heridas superficiales	21
<i>Figura 6.</i> Diámetro de halos de inhibición (mm) del crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i> por efecto de miel. A. Algarrobo, B. Zapote, C. Multifloral	23
<i>Figura 7.</i> Diámetro de halos de inhibición de <i>Escherichia coli</i> por efecto de la miel de abeja. A. algarrobo 100 %, B. zapote al 100%, C. Algarrobo, zapote y multifloral al 40 y 30% v/v respectivamente.....	27
<i>Figura 8.</i> Identificación bioquímica y antibiograma de especies aisladas realizado en equipo Microscan	41
<i>Figura 9.</i> Antibiograma para la cepa N°3 de <i>S. aureus</i>	42
<i>Figura 10.</i> Antibiograma para la cepa N°1 de <i>E. coli</i>	42

I. INTRODUCCIÓN

Staphylococcus aureus y *Escherichia coli* son las bacterias involucradas en la mayoría de infecciones de carácter dérmico y urinarias respectivamente; así *Staphylococcus aureus* ocasiona infección primaria de piel o piodermitis, padecimiento común en niños de 2 a 5 años aunque puede ocurrir a cualquier edad, la característica son múltiples lesiones vesiculares sobre una base eritematosa, los factores predisponentes asociados al huésped son inmunosupresión, vasculopatía, neuropatía y disminución del drenaje linfático, mientras que los externos incluyen abrasiones dérmicas, trauma, quemadura, picadura de insectos, varicela, higiene deficiente y otros (López y Lartchenko, 2006).

Escherichia coli por otro lado es un agente causal de infecciones extraintestinales e intestinales, las primeras incluyen infecciones oportunistas a nivel superficial como infecciones de heridas, otitis, mastitis, panofthalmitis y con menor frecuencia pueden complicar cuadros de periodontitis provocando septicemias o predisponiendo a enfermedades cardiovasculares; las infecciones entéricas por dicho patógeno incluyen diversos tipos de diarreas que pueden ser leves o severas, éstas últimas de mayor gravedad en las poblaciones de lactantes, niños menores y ancianos (Turcios, 2007).

Diversos estudios dan cuenta de la importancia de las bacterias mencionadas y su resistencia a los antimicrobianos, así por ejemplo, en la ciudad de Cajamarca los aislamientos de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* representan las bacterias con mayor incidencia, en ambas se evidencia un aumento en la resistencia a los antibióticos. (Vera, 2014). Otros estudios como el realizado en hospitales de Lima – Perú, revelan que el 58% de cepas de *S. aureus* son resistentes a la

meticilina. Así mismo que cepas de *E. coli* son resistentes a cefalosporinas de tercera generación (Mosquito *et al.*, 2011).

Por otro lado, desde tiempos remotos, se ha reconocido a la miel de abeja propiedades antibacterianas y terapéuticas, siendo utilizada en el tratamiento de heridas, traumatismos, quemaduras, infecciones y trastornos respiratorios, dichas propiedades se le han atribuido a factores como la osmolaridad, pH y con los niveles de peróxido de nitrógeno que contiene (Cabrera *et al.*, 2003). Algunos autores refieren su uso eficaz en el tratamiento de heridas superficiales infectadas con *Staphylococcus aureus*, así como su acción antimicrobiana sobre *Escherichia coli* (Turcios, 2007). Empíricamente la miel es utilizada en emplastos sobre heridas superficiales con buenos resultados curativos y preventivos.

Por todo lo expuesto y teniendo en cuenta la falta de referencias de estudios que relacionen la acción antibacteriana de la miel de abeja de la provincia de Lambayeque, se cuestionó, ¿Tiene efecto inhibitorio *in vitro* la miel de abeja a diferentes concentraciones sobre *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* aisladas de heridas superficiales? Considerando que la miel de abeja tiene efecto inhibitorio *in vitro* frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, se planteó el presente estudio con los objetivos de:

Identificar *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* aisladas de heridas superficiales y determinar el efecto inhibitorio *in vitro* de la miel de abeja a concentraciones de 10, 20, 30, 40 y 50% v/v y 100% sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* aisladas de heridas superficiales. Los resultados obtenidos permiten un sustento científicamente obtenido acerca de la inhibición del crecimiento microbiano por efecto de la miel de abeja con lo que se incrementa su valor como recurso natural.

II. ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

Staphylococcus aureus y *Escherichia coli* son dos de las principales bacterias aisladas de heridas, así lo demostró la investigación realizada por Aguirre *et al.* (1992) en heridas quirúrgicas, en la que se identificó *Staphylococcus aureus* en el 12% de las heridas y enterobacteriaceas en el 41.9%, en este último caso con prevalencia de *Escherichia coli* y *Klebsiella sp.* También se reportó aislamientos de *Pseudomonas sp.*, *Enterococcus sp.*, *Streptococcus sp.*, *Candida sp.*, *Citrobacter sp.* y *Proteus sp.*, en menor porcentaje.

Pérez *et al.*, (2012) ejecutaron la investigación “Prevalencia de infección de heridas quirúrgicas, causas y resistencia” en la que determinaron una prevalencia del 25% de *Staphylococcus aureus* y del 22.3% para *Escherichia coli*, para ambas bacterias la prevalencia fue mayor en el género masculino, particularmente en personas de más de 70 años de edad; así mismo determinaron que el mayor porcentaje de *Staphylococcus aureus* identificados fue resistente a la meticilina. Consideran los autores que los microorganismos son la principal causa de infecciones de heridas quirúrgicas.

Con la finalidad de determinar la prevalencia de la resistencia bacteriana en heridas quirúrgicas de pacientes del Hospital Central Militar, Osorio *et al.* (2015) procesaron 523 muestras, encontrando *Staphylococcus aureus* en 35.38% y *Escherichia coli* en 20% de los casos. La mayor resistencia antimicrobiana en bacterias grampositivas fue a la ampicilina y penicilina (86.32%) y eritromicina y oxacilina (68.42%) y en las bacterias gramnegativas a cefipime (88.54%) y ciprofloxacino (0.21%).

Uno de los primeros estudios ejecutados con miel de abeja es el reportado por Cooper *et al.*, (1999) quienes evaluaron la sensibilidad bacteriana de 58 cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de heridas infectadas frente a dos tipos de mieles, provenientes de diferentes estados de United Kingdom (Europa). Concluyeron los autores que el efecto inhibitorio fue directamente proporcional a su concentración ya que ambas mieles a concentraciones del 5% inhibieron el crecimiento de *Staphylococcus aureus* observándose mayor inhibición a una concentración del 25 %.

Se determinó la actividad antimicrobiana *in vitro* de miel de abeja natural sobre diferentes bacterias. Se utilizó miel de abeja pura de la ciudad de Morocco (España) a concentraciones de 6,25%, 12,5%, 25% y 50 % y 6 especies bacterianas, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Bacillus megatium*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus sp.* El método aplicado fue de difusión de disco. Después de la incubación se midió la zona del halo de inhibición en milímetros. Se obtuvo la presencia de halo de inhibición de 10mm en todas las siembras de bacterias a una concentración de la miel del 50% y en algunas bacterias a una concentración del 25% Noaman *et al.* (2015).

Aguilera *et al.*, (2009), evaluaron la actividad antimicrobiana de nueve mieles venezolanas frente a cepas ATCC de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Las mieles se utilizaron puras y diluidas (1:2; 1:4; 1:8). Se observó la inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus* en todas las mieles utilizadas sin diluir y diluido al 1:2, mientras que no se observó inhibición del crecimiento de las cepas de *Escherichia coli* a ninguna concentración, por lo tanto hace una referencia de 6 mm con respecto al disco de sensibilidad.

El potencial antibacteriano sobre microorganismos orales de dos tipos miel de abeja obtenidas de plantas indígenas de South África y de dos tipos de miel de abeja obtenidas de plantas exóticas fue investigado por Bason *et al.*, (2008), Las mieles fueron utilizadas a concentraciones de 50%, 25%, 12.5%, 6.25% y 3.12% y los microorganismos orales evaluados fueron *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sobrinus*, *Cándida albicans*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Se concluyó que la inhibición del crecimiento bacteriano se obtuvo a concentraciones de 50%, 25% y 12.5%, y no hay diferencia significativa considerando los tipos de miel y que el efecto fue el mismo para mieles de plantas indígenas y para mieles de plantas exóticas. Además al 50% el efecto de inhibición fue mayor.

Badect y Quero (2012), evaluaron la actividad antibacteriana de la miel de abeja obtenida de manuka (planta silvestre común en Nueva Zelanda) sobre la placa dentaria. . El estudio se realizó en 3 voluntarios elegidos al azar, se les dio una cucharada de miel de abeja la cual tenían que contener por 10 minutos en boca, tres veces al día. Después de 21 días se observó una reducción de placa bacteriana (48% a 17%; $p= 0.001$) Concluyeron que la miel de abeja presenta un gran potencial terapéutico en el tratamiento de gingivitis y enfermedad periodontal después de haber evaluado el estado gingival de los participantes.

Los componentes químicos y el efecto antibacteriano de la miel de abeja frente a bacterias gram positivas y gram negativas como *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* fueron investigados por Cruzado *et al.*, (2007); en dicho trabajo se procesaron bacterias causantes de enfermedades prevalentes en la población y se empleó el método de difusión de discos sobre unidades formadoras de colonia.

Las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* fueron inhibidas con halos de 10 mm y con miel de abeja a una concentración de 50% para los microorganismos antes mencionados; algunas bacterias se inhibieron con miel de abeja a una concentración del 25% dando como resultado una buena inhibición antibacteriana.

López (2013), investigó el potencial antibacteriano sobre microorganismos orales de dos tipos se utilizaron mieles de abeja procedentes de plantas indígenas de South África y de otras dos mieles de abeja obtenidas de plantas exóticas, en todos los tipos a concentraciones de 50%, 25%, 12.5%, 6.25% y 3.12%. Los microorganismos orales utilizados fueron *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sobrinus*, *Cándida albicans*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. Se concluyó que, el efecto inhibitorio se produjo a partir de la concentración de 12.5% y fue directamente proporcional a la concentración, al 50% de miel de abeja ningún microorganismo creció no existiendo diferencia estadística entre las cuatro mieles de abeja.

Se estudió la sensibilidad de *Escherichia coli* ATCC 25922 frente a mieles del sudeste de la provincia de Buenos Aires a concentraciones de 0, 1, 5, 10, 25 y 50% (p/v). La concentración inhibitoria mínima (CIM) se determinó por el test de dilución en serie en caldo Müeller-Hinton y caldo Mac Conkey; la concentración bactericida mínima (CBM) se evaluó en agar nutritivo y en agar Mac Conkey. Se observó una reducción del crecimiento promedio del 96% en caldo Mueller-Hinton y del 90% en caldo Mac Conkey, coincidiendo con CIMs de 50 y 25% (p/v), respectivamente.

En el mencionado estudio los autores encontraron que en agar nutritivo no se observó acción bactericida, mientras que en agar Mac Conkey se obtuvo una CBM promedio de 25% (p/v). Con el método de difusión en agar en placa, todas las mieles al 50% (p/v) inhibieron el crecimiento de *E. coli* y una de ellas presentó actividad aún a concentraciones menores (25, 10 y 5% p/v). Las diferentes metodologías resultaron adecuadas para medir la magnitud de la actividad antibacteriana y mostraron que las mieles son activas frente a *E. coli* a concentraciones de 25 y 50% (p/v). Los métodos de dilución en caldo Mueller-Hinton y de difusión en agar en placa arrojaron valores de inhibición concordantes (Fangio *et al.*, 2007).

Seis cultivos de *Staphylococcus aureus* en caldo nutritivo con una determinada cantidad de colonias a las cuales se aplicó miel de abeja en concentraciones de 30%, 60% y 100% para observar el efecto antibacteriano a través de un cultivo en agar sangre en otras 24 hrs. Se comprobó la actividad bactericida frente a dicha bacteria y se pudo constatar que la miel de abeja a una mayor concentración produce mayor efecto antibacteriano sobre el *Staphylococcus aureus*. (Becerra *et al.*, 2016).

El estudio “Evaluación del poder bactericida sobre *E. coli* ATCC25922 de cinco tipos diferentes de miel de abeja existentes en Guatemala” fue ejecutado por Turcios (2007); en una primera etapa se realizó el enfrentamiento de la miel contra *Escherichia coli* confirmando su efectiva actividad bactericida en cuatro de las muestras analizadas ($p < 0.05$), siendo la miel del departamento de Escuintla la que no presentó acción inhibitoria. En la segunda etapa se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria aplicando la metodología planteada por Mitscher (en agar Mueller-Hinto) demostrando que la miel procedente de los

departamentos de Guatemala, Chiquimula y El Progreso a concentración de 0.25 mg/ml inhibieron el crecimiento de *Escherichia coli*, mientras que la miel del departamento de Quetzaltenango inhibió a la misma bacteria a 0.70 mg/ml. Se concluyó que la miel es un medio natural adecuado para inhibir el crecimiento de *Escherichia coli*.

2.1. Bases teóricas

Las infecciones por *Staphylococcus aureus* se producen al combinarse los factores de virulencia bacteriana con una disminución de las defensas del huésped. Intervienen los componentes de la pared celular y la producción de enzimas y toxinas favorecedoras de la invasión tisular. Se caracterizan por la formación de vesículas pustulosas que comienzan en los folículos pilosos propagándose a los tejidos vecinos. La foliculitis o infección del folículo piloso se puede extender al tejido perifolicular formando un forúnculo. La infección de varios forúnculos con extensión a la capa más profunda del tejido subcutáneo es el ántrax, que produce bacteriemia en un tercio de los casos. Otras infecciones son impétigo, mastitis, hidrosadenitis supurada, celulitis, fascitis y paroniquia. También puede causar úlceras por presión, pie diabético. Noaman *et al.*, (2015).

Escherichia coli es un huésped habitual del tracto intestinal del hombre se le involucra frecuentemente con infecciones del tracto urinario. Las infecciones que produce son divididas en extraintestinales e intestinales, las cuales pueden derivar a septicemia, meningitis, neumonía y sobreinfecciones periodontales en éste caso se complica el cuadro clínico pudiendo causar infecciones sistémicas al entrar en el torrente sanguíneo, así

las enterobacteriaceas en placa subgingival aumentaría el riesgo de enfermedad cardiovascular (Turcios, 2007).

2.1.1. Miel de abeja

La miel es un producto elaborado por las abejas a base del néctar de las flores, las abejas enriquecen y transforman este néctar con sustancias que generan en su propio cuerpo, y la depositan y la almacenan en los panales donde la hacen madurar, presenta un pH ácido que varía de 3.2 a 4.5. La abeja contribuye con la estabilización de la miel añadiéndole enzimas. Al romper el disacárido sacarosa, en levulosa y dextrosa (monosacáridos), la abeja hace factible un aumento en la eficiencia de almacenaje de calorías. (De la Rosa y Prieto, 2010). Su color está determinado, principalmente, por la fuente floral; sin embargo, no se han podido identificar a cabalidad cuales son los agentes responsables de impartir el color al néctar aunque se sabe que además de los minerales que se obtienen del suelo, los pigmentos de origen vegetal pueden contribuir al color de la miel. Entre estos; los carotenos, las xantofilas y las antocianinas que son constituyentes vegetales derivados de la clorofila (Anexo 1).

Su aspecto es líquido denso, su sabor depende de la naturaleza de las plantas, el terreno, el clima durante la recolección de néctar y la estación del año. La acidez depende del tipo de néctar utilizado por la abeja para su conversión en miel, aunque varía de acuerdo con la flora existente, y ésta varía a su vez de acuerdo a la altitud del lugar.

La evaporación de agua hace posible una alta concentración de azúcares (80-83%) por unidad de volumen, lo que genera una presión osmótica elevada. Esta alta concentración de azúcares, resultado de una sobresaturación, afecta las funciones metabólicas celulares al punto de arrestar su metabolismo y en algunos casos provocar la muerte celular. Al haber una concentración tan alta de azúcares, las células se saturan de su agua metabólica y los procesos celulares se ven afectados.

2.1.2. Componentes de la miel de abeja

Agua 18%, carbohidratos (fructosa 38%, glucosa 31%, sacarosa 1%, maltosa, 7.5%, otros azúcares 5%), proteínas y aminoácidos, vitaminas, enzimas, hormonas y ácidos orgánicos 0.5 – 1%, minerales 0.5 – 1.5%, cenizas 0.2 – 1.0 %.El contenido en minerales es muy pequeño. Los más frecuentes son calcio, cobre, hierro, magnesio, manganeso, zinc, fósforo y potasio. Están presentes también alrededor de la mitad de los aminoácidos existentes, ácidos orgánicos (ácido acético, ácido cítrico, entre otros) y vitaminas del complejo B, C, D y E. La miel posee también una variedad considerable de antioxidantes (flavonoides y fenólicos).

2.1.3. Variedades más representativas de miel de abeja en el Perú

Norte (Piura, Lambayeque, La Libertad): Miel de algarrobo y/o zapote. Costa Central (Lima, Ica, etc.): Miel de naranjo, algodón y níspero. Sierra (Huancayo, Ancash, Ayacucho): Miel de eucalipto y

multifloral. Selva (Oxapampa, San Martín, etc.): Miel de chuca y multifloral. (González, 1995.)

2.1.4. Efecto antibacteriano

Efecto antibacteriano Se considera que es debido a:

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

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

Sin embargo, hay componentes importantes que son los fitoquímicos, sustancias que provienen de la floración visitada por la abeja para la colecta del néctar. Dentro de este grupo están los flavonoides, que presentan propiedades antioxidantes y antimicrobianas, y son reconocidos por inhibir un amplio rango de bacterias gram positivas y gram negativas.

Hoy se sabe que la hipótesis más aceptada sobre el efecto antibacteriano de la miel de abeja se debe principalmente a la presencia de la enzima llamada “inhibina”. Estas inhibinas consisten

en peróxido de hidrógeno, flavonoides y ácidos fenólicos, además de otras sustancias aún sin identificar (López, 2013).

2.1.5. Efecto farmacológico

Uno de los principales beneficios de la miel es la aplicación tópica en quemaduras. El alto contenido de fructosa de la miel ha llevado a que se utilice para elevar el metabolismo de alcohol en pacientes con alcoholismo. También se ha demostrado que sirve como fuente natural de antioxidantes, los cuales son efectivos para reducir el riesgo de enfermedades del corazón, del sistema inmune, cataratas y diferentes procesos inflamatorios. Por otro lado, se recomienda una gota de miel pura en cada ojo para lavar y remover molestias de los mismos. En términos generales al utilizar miel en un paciente es menos probable que se haga daño al paciente, en comparación con otras sustancias químicas preparadas por el ser humano. También es un suplemento alimenticio y un tonificador excelente (Ríos y Boris, 2011).

III. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACION

3.1. Unidad de análisis

Muestras de miel de abeja del árbol de zapote, miel de abeja del árbol de algarrobo y miel multifloral, procedentes del Distrito de Motupe - Departamento de Lambayeque,

3.2. Población y muestra

Considerando el primer objetivo de la investigación la población corresponde a 36 secreciones de heridas superficiales y muestra fue 22. Teniendo en cuenta el segundo objetivo del efecto inhibitorio *in vitro* de la miel de abeja sobre cepas de *S.aureus* y *E.coli* y por ser de carácter experimental la población y muestra corresponden a 324 equivalente a 3 tipos de miel de abeja (algarrobo, zapote y multifloral), 6 concentraciones (10, 20, 30, 40 y 50 % v/v y 100%) 6 cepas de *S.aureus* y 3 cepas de *E.coli* considerando 3 repeticiones por ensayo se totaliza 972 unidades experimentales.

3.3. Tipo de investigación y diseño de contrastación de hipótesis

La investigación es de carácter experimental y el Diseño de contrastación de Hipótesis corresponde al de Estímulo Creciente.

3.4. Variables de estudio

3.4.1. Variable Independiente:

Miel de abeja a diferentes concentraciones

3.4.2. Variable Dependiente:

Crecimiento de las cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, aisladas de heridas superficiales

3.5. Procedimiento

3.5.1. Identificación de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* aisladas de heridas superficiales

Las cepas de *Staphylococcus aureus* y de *Escherichia coli* se aislaron de secreciones de heridas colectadas y procesadas en el Laboratorio Llontop – Cajamarca, sirviendo como guía el Manual de Procedimientos Bacteriológicos en Infecciones Intrahospitalarias - Instituto Nacional de Salud –Serie de Normas Técnicas N°28 (fig. 1).



Figura 1. Paciente con herida purulenta.

3.5.1.1. Obtención de la muestra:

- Se realizó una buena asepsia de los bordes de la herida con agua y jabón. La limpieza se realizó de adentro hacia fuera en forma concéntrica.
- Se retiró el exudado de la superficie enjuagando y limpiando con solución salina estéril.

- Se separó suavemente los bordes de la herida con el pulgar e índice de una mano.
- Con la otra mano, cuidando de no tocar los bordes cutáneos adyacentes, se introdujo la punta del hisopo en la profundidad de la herida. Se obtuvo la muestra rotando el hisopo y avanzando hacia fuera sin tocar el borde de la herida.
- Se tomaron dos muestras: Una muestra para cultivo se colocó en un medio de transporte (Amies) el cual se mantuvo a una temperatura ambiente, y con la segunda se realizó una coloración Gram.

3.5.1.2. Siembra de la muestra

- Las muestras se sembraron por el método de agotamiento por estría para esto se utilizaron dos medios de cultivo Agar MacConkey y Agar Manitol Salado, previo control de esterilidad, se sembraron por estría en ambos agares.
- Las placas se incubaron a 35°C por 24 a 48 horas en condiciones aeróbicas.

3.5.1.3. Identificación de *Staphylococcus aureus*

- Del Agar Manitol Salado se escogieron las colonias lisas, enteras, algo elevadas con medidas de aproximadamente 1 a 3 mm de diámetro. La mayoría de ellas presentaron un pigmento amarillo, su confirmación se realizó por coloración Gram, prueba de catalasa y prueba de coagulasa (figura 2)

3.5.1.4. Identificación de *Escherichia coli*:

- Las colonias de *Escherichia coli* fueron identificadas en Mc Conkey con lactosa positiva de borde entero y color fucsia de 2 – 3 mm de diámetro.
- Una vez identificadas las colonias se sembraron en los medios diferenciales empezando por el agar citrato, urea (en la superficie), TSI, LIA (introduciendo el asa por el centro hasta tocar el fondo del tubo, retirar por el mismo trazo y sembrar en estría la parte inclinada), caldo para la prueba de indol, MRVP
- Se Incubó a 35 – 37 °C de 18 a 24 horas.
- Los procedimientos y lecturas se realizaron según los protocolos.(figura 2)

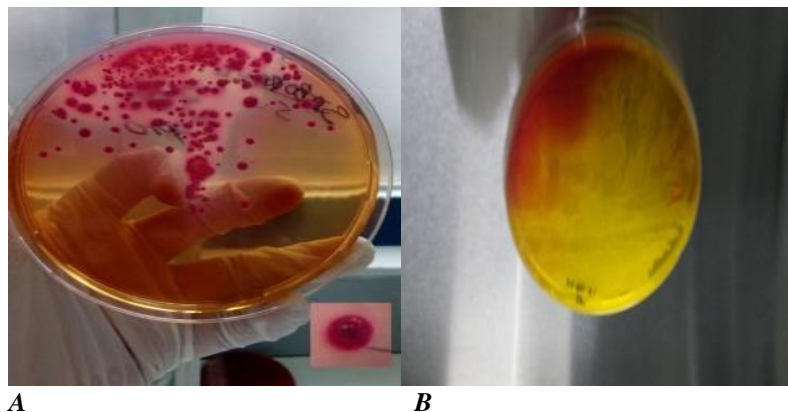


Figura 2. Aislamiento de bacterias de secreciones de heridas. A. *Escherichia coli* en agar Mc Conkey y B. *Staphylococcus aureus* en agar Manitol salado

3.5.2. Determinación del efecto inhibitorio in vitro de la miel de abeja a diferentes concentraciones sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* aisladas de heridas superficiales

3.5.2.1. Obtención de la miel de abeja y sus concentraciones:

- La miel de abeja de algarrobo y la miel de abeja de zapote se obtuvieron por compra directa a un apicultor de la zona y la miel de abeja multifloral se adquirió en el mercado de abastos de la ciudad de Motupe – Lambayeque previa coordinación. Teniendo en cuenta una correcta recolección, para evitar la contaminación de la miel se utilizaron frascos color ámbar esterilizados, la muestra fue almacenada a una temperatura aproximada de 25 °C según las recomendaciones de Cabrera *et al.*, 2003 modificado.
- Para preparar las concentraciones de miel se partió del hecho que el producto puro está al 100 % de concentración, para obtener la concentración al 10% v/v se midió 1 mL de miel y 9 mL de solución salina fisiológica, para la concentración 20%, 2 mL de miel y 8 mL solución salina fisiológica, para las concentraciones de 30, 40 y 50 % v/v se diluyeron 3, 4 y 5 mL de miel en 7, 6 y 5 mL en solución salina fisiológica respectivamente (fig. 3)

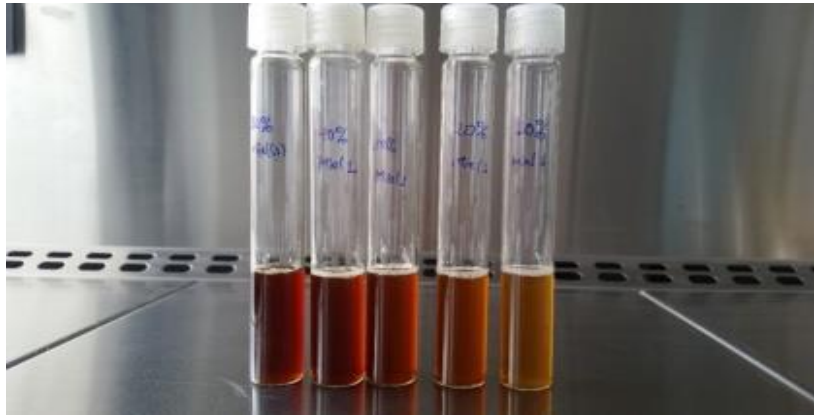


Figura 3. Diluciones de la miel de abeja al 50, 40, 30, 20 y 10% v/v

3.5.2.2. Estandarización del inóculo bacteriano (DIFCO, 1987)

- Las cepas reactivadas se estandarizaron por Nefelometría con el tubo N° 0.5 del Nefelómetro de Mc Farland y se obtuvo una concentración equivalente a 1.5×10^8 bacterias /ml de modo que se trabajó con una biomasa estándar en todos los ensayos.

3.5.2.3. Preparación de discos de susceptibilidad

- Se utilizó papel Whatman N° 01 del cual se obtuvieron discos de 5 mm de diámetro con ayuda de un perforador. Los discos se colocaron dentro de tubos de ensayo y se esterilizaron en autoclave (15 Lb. de presión a 121°C por 15 minutos). Se dejó secar en horno a 60°C por 24 horas (fig. 4).



Figura 4. Discos preparados y esterilizados aptos para ser embebidos en miel

3.5.3. Ensayo del efecto inhibitorio de miel de abeja sobre cepas bacterianas (método modificado de difusión de Kirby Bauer en Kinsbruy, 1991 y Sacsquispe y Velásquez, 2002).

- En placas Petri previamente esterilizadas se sirvió 10 ml de agar Müller Hilton y se dejó solidificar para posteriormente realizar el control de esterilidad llevándolas a incubación a 37 °C por 24 horas.
- Se embebió el hisopo estéril con el inóculo estandarizado, eliminando el exceso por rotación firme contra la pared interna del tubo y se sembró superficialmente por estría en tres direcciones diferentes, con el fin de cubrir toda la superficie del agar. Se dejó secar durante cinco minutos.
- Se colocaron los discos impregnados con la solución de miel de abeja a diferentes concentraciones a una distancia de 15 – 20 mm.
- Posteriormente se llevaron las placas a incubación a 37°C/24 horas. Transcurrido el tiempo se midieron los halos de inhibición (mm), registrando la medida para cada una de las cepas.

3.6. Análisis estadístico

Se aplicó el análisis de varianza (**ANNOVA**) con arreglo factorial 6 x 3 x 3 x 6, siendo los dos primeros factores las cepas bacterianas, el tercer factor los 3 tipos de miel de abeja y el cuarto factor las 6 concentraciones de la miel de abeja. Este análisis permitió determinar si existe efecto inhibitorio de la miel sobre las cepas bacterianas y si dicho efecto es dependiente o no de las cepas o de las concentraciones del producto. Se complementó el análisis con la prueba de Tukey (Alvitres, 2000). Se utilizó el software estadístico Statistic versión 6 y Ms Excel 2000.

IV. RESULTADOS

De las 36 muestras de heridas superficiales, en 22 se encontraron microorganismos así se identificó 6 cepas de *Staphylococcus aureus* y 3 cepas de *Escherichia coli*, (Tabla 1, fig.5 y Fig.8 anexo) y en 13 muestras se encontró otros microorganismos como *Pseudomonas sp.*, *Enterococcus sp.*, *Streptococcus sp.*, *Klebsiella sp.*, *Candida sp.* y *Aeromonas sp.*, entre otros; en ningún caso en porcentajes mayores a los de las bacterias estudiadas.

Tabla 1. *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* aisladas de heridas superficiales

Microorganismos	Positivo	%
<i>Staphylococcus aureus</i>	6	27.27
<i>Escherichia coli</i>	3	13.64
Otros microorganismos	13	59.09
TOTAL	22	100

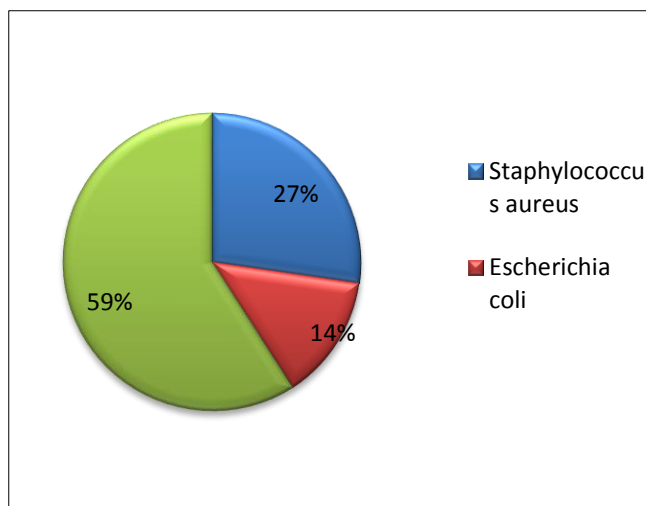


Figura 5. *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* aisladas de heridas superficiales

El efecto inhibitorio *in vitro* de la miel de algarrobo a concentraciones de 10%, 20%, 30% y 40% sobre las cepas de *Staphylococcus aureus* fue

igual y no significativo, a la concentración de 50%v/v y al 100 % la inhibición fue evidente siendo directamente proporcional a la concentración de la miel (Tabla 2 y Fig. 6a).

Tabla 2. Diámetro de halos de inhibición (mm) del crecimiento de *Staphylococcus aureus* aislada de heridas superficiales por efecto de miel de abeja de algarrobo a diferentes concentraciones

Miel de Algarrobo %	CEPAS					
	1	2	3	4	5	6
10	6	6	6	6	6	6
20	6	6	6	6	6	6
30	6	6	6	6	6	6
40	6	6	6	6	6	6
50	16	17	16	17	17	17
100	22	23	21	18	21	23

Con la miel de abeja de zapote los resultados sobre *Staphylococcus aureus* fueron similares a los obtenidos con la miel de abeja de algarrobo (Tabla 3 y Fig. 6b).

Tabla 3. Diámetro de inhibición (mm) del crecimiento de *Staphylococcus aureus* aislada de heridas superficiales por efecto de miel de abeja de zapote a diferentes concentraciones

Miel de Zapote %	CEPA					
	1	2	3	4	5	6
10	6	6	6	6	6	6
20	6	6	6	6	6	6
30	6	6	6	6	6	6
40	6	6	6	6	6	6
50	15	17	17	17	16	17
100	18	20	19	20	21	19

Con la miel de abeja multifloral las cepas de *Staphylococcus aureus* fueron más resistentes de tal forma que dicho producto evidenció efecto inhibitorio sólo a concentración del 100% (Tabla 4 y Fig 6c)

Tabla 4. Diámetro de inhibición (mm) del crecimiento de *Staphylococcus aureus* aislada de heridas superficiales por efecto de miel de abeja de multifloral a diferentes concentraciones

Miel procesada multifloral %	CEPA					
	1	2	3	4	5	6
10	6	6	6	6	6	6
20	6	6	6	6	6	6
30	6	6	6	6	6	6
40	6	6	6	6	6	6
50	6	6	6	6	6	6
100	17	18	15	17	17	17

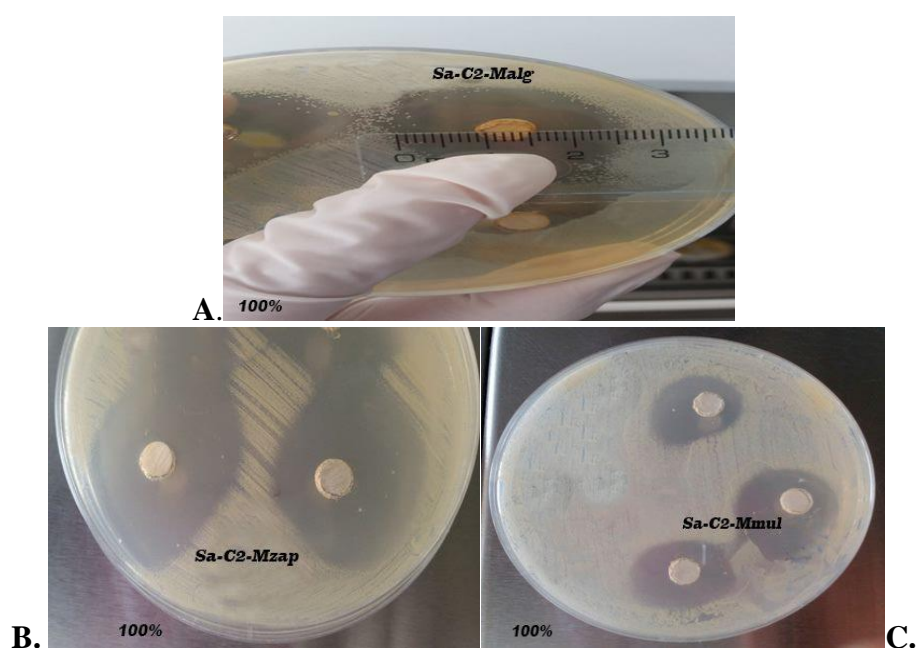


Figura 6. Diámetro de halos de inhibición (mm) del crecimiento de *Staphylococcus aureus* por efecto de miel. A. Algarrobo, B. Zapote, C. Multifloral

El análisis estadístico de varianza del efecto inhibitorio de miel de abeja frente a *Staphylococcus aureus* mostró diferencias significativas, tanto para las concentraciones de la miel, como para los tipos de miel y las cepas probadas (Tabla 5).

Tabla 5. Análisis de Varianza del efecto inhibitorio *in vitro* de tres tipos de miel de abeja a seis concentraciones sobre seis cepas de *Staphylococcus aureus*.

Ho: $C_{10\%} = C_{20\%} = C_{30\%} = C_{40\%} = C_{50\%} = C_{100\%}$

Ho: $M_A = M_S = M_m$

Ho: $C_1 = C_2 = C_3 = C_4 = C_5 = C_6$

Fuente de Variación	suma de cuadrados	GL	CM	F	P
Concentración	8357.04	5	1671.41	4952.77	0.000000
Miel	399.41	2	199.70	591.77	0.000000
Cepa	6.41	5	1.28	3.80	0.002567
cc*miel	1129.78	10	112.98	334.78	0.000000
cc*cepa	24.11	25	0.96	2.86	0.000021
miel*cepa	9.63	10	0.96	2.85	0.002343
cc*miel*cepa	49.85	50	1.00	2.95	0.000000
Error	72.89	216	0.34		

GL: Grados de libertad. GL: Grados de libertad. CM: Cuadros medios

P<0.05: Diferencia estadística significativa

Según las concentraciones de miel, el efecto inhibitorio sobre las cepas de *Staphylococcus aureus* fue similar a las concentraciones de 10, 20, 30 y 40% v/v, sin embargo a concentraciones de 50% v/v y al 100%, el efecto inhibitorio fue mayor y directamente proporcional a la concentración (Tabla 6.)

Tabla 6. Prueba de significación de Tukey (0.05) del efecto inhibitorio *in vitro* de miel de abeja sobre *Staphylococcus aureus* según concentraciones de miel

Concentración	Promedio	Significación	
20	6.00000	a	
30	6.00000	a	
40	6.00000	a	
10	6.00000	a	
50	13.07407		b
100	19.14815		C

Letras diferentes: Diferencia significativa

Se muestra en la Tabla 7 la prueba de Tukey que determina que el efecto inhibitorio de la miel de abeja multifloral es significativamente menor al efecto inhibitorio de la miel de abeja de zapote y ésta a su vez tiene un efecto inhibitorio menor que el de la miel de abeja de algarrobo

Tabla 7. Prueba de significación de Tukey (0.05) del efecto inhibitorio *in vitro* de miel de abeja sobre *Staphylococcus aureus* según tipo de miel.

Miel	Halo	1	2	3
Multifloral	7.81481	a		
Zapote	9.96296		B	
Algarrobo	10.33333			c

Nota: Letras diferentes: Diferencia significativa

Según cepa, las cepas 4 y 1 de *Staphylococcus aureus* fueron las menos sensibles a los diferentes tipos de miel, les siguieron las cepas 3, 5 y 6, finalmente la cepa 2 fue la que demostró una mayor sensibilidad, estadísticamente diferente a todas las anteriores (Tabla 8).

Tabla 8. Prueba de significación de Tukey (0.05) del efecto inhibitorio *in vitro* de miel de abeja sobre *Staphylococcus aureus* según cepa.

Cepa	Halo	1	2
4	9.222222	a	
1	9.222222	a	
3	9.259259	a	B
5	9.462963	a	B
6	9.481481	a	B
2	9.574074		B

El efecto inhibitorio *in vitro* de la miel de abeja de algarrobo a concentraciones de 10%, 20%, 30% y 40% sobre las cepas de *Escherichia coli* fue similar, para la concentraciones de 50% v/v y al 100% hubo un incremento de la inhibición; siendo esta directamente proporcional a la concentración de la miel (Tabla 9 y fig.7a)

Tabla 9. Diámetro de halos de inhibición en (mm) del crecimiento de *Escherichia coli* aislada de heridas superficiales por efecto de miel de abeja de algarrobo a diferentes concentraciones.

Miel de Algarrobo %	CEPA		
	1	2	3
10	6	6	6
20	6	6	6
30	6	6	6
40	6	6	6
50	8	8	8
100	10	12	12

Con la miel de abeja de zapote los resultados fueron similares a los obtenidos con la miel de abeja de algarrobo (Tabla 10y fig7b).

Tabla 10. Diámetros de halos de inhibición (mm) del crecimiento de *Escherichia coli* aislada de heridas superficiales por efecto de miel de abeja de zapote a diferentes concentraciones

Miel de Zapote %	CEPA		
	1	2	3
10	6	6	6
20	6	6	6
30	6	6	6
40	6	6	6
50	8	8	8
100	9	11	12

Con la miel de abeja multifloral las cepas de *Escherichia coli* fueron más resistentes de tal forma que dicho producto tubo efecto inhibitorio sólo al 100%.(Tabla 11y fig. 7c)

Tabla 11. Diámetro de halos de inhibición (mm) del crecimiento de *Escherichia coli* aislada de heridas superficiales por efecto de miel de abeja de multifloral a diferentes concentraciones.

Miel procesada Multifloral %	CEPA		
	1	2	3
10	6	6	6
20	6	6	6
30	6	6	6
40	6	6	6
50	6	6	6
100	9	11	11

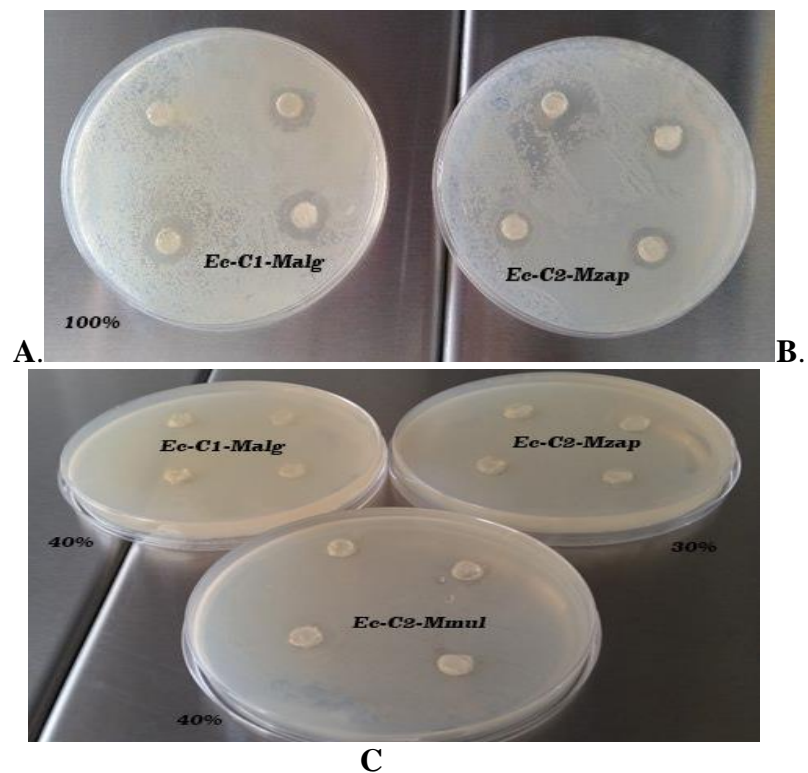


Figura 7. Diámetro de halos de inhibición de *Escherichia coli* por efecto de la miel de abeja. A. algarrobo 100 %, B. zapote al 100%, C. Algarrobo, zapote y multifloral al 40 y 30%v/v respectivamente

El análisis estadístico de varianza del efecto inhibitorio de miel de abeja frente a *Escherichia coli* mostró diferencias significativas, tanto para las concentraciones de la miel, como para los tipos de miel y las cepas probadas (Tabla 12)

Tabla 12. Análisis de Varianza del efecto inhibitorio *in vitro* de tres tipos de miel de abeja a seis concentraciones sobre seis cepas de *Escherichia coli*.

Ho: $C_{10\%} = C_{20\%} = C_{30\%} = C_{40\%} = C_{50\%} = C_{100\%}$

Ho: $M_A = M_S = M_m$

Ho: $C_1 = C_2 = C_3$

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	GL	Cuadrado medio	F	P
CC	528.130	5	105.626	362.76	0.000000
MIEL	7.444	2	3.722	12.78	0.000010
CEPA	4.704	2	2.352	8.08	0.000538
CC*MIEL	23.148	10	2.315	7.95	0.000000
CC*CEPA	20.778	10	2.078	7.14	0.000000
MIEL*CEPA	0.407	4	0.102	0.35	0.843672
CC*MIEL*CEPA	1.222	20	0.061	0.21	0.999889
Error	31.447	108	0.291		

GL: Grados de libertad. GL: Grados de libertad. CM: Cuadros medios
 $P < 0.05$: Diferencia estadística significativa

Según concentraciones de miel, el efecto inhibitorio sobre las cepas de *Escherichia coli* fue similar a las concentraciones de 10, 20, 30 y 40% v/v, sin embargo a concentraciones de 50% v/v y 100%, el efecto inhibitorio fue mayor y directamente proporcional a la concentración (Tabla 13)

Tabla 13. Prueba de significación de Tukey (0.05) del efecto inhibitorio *in vitro* de miel de abeja sobre *Escherichia coli* según concentraciones de miel.

CC	HALO	1	2	3
20	6.00000	a		
30	6.00000	a		
40	6.00000	a		
10	6.00000	a		
50	7.40741		b	
100	10.92593			C

En la tabla 14 se muestra la prueba de Tukey que determina que el efecto inhibitorio de la miel de abeja multifloral es significativamente menor al efecto inhibitorio de la miel de abeja de zapote y de la miel de abeja de algarrobo, teniendo estos dos últimos el mismo efecto inhibitorio

Tabla 14. Prueba de significación de Tukey (0.05) del efecto inhibitorio *in vitro* de miel de abeja sobre *Escherichia coli* según tipo de miel.

MIEL	HALO	1	2
MUL	6.759259	a	
ZAP	7.148148		b
ALG	7.259259		b

Según cepa, la cepa 1 de *Escherichia coli* fue la menos sensible a los diferentes tipos de miel, siguieron las cepas 2 y 3, teniendo mayor sensibilidad, estadísticamente diferente a las anteriores (Tabla 15).

Tabla 15. Prueba de significación de Tukey (0.05) del efecto inhibitorio *in vitro* de miel de abeja sobre *Escherichia coli* según tipo de cepas.

CEPA	HALO	1	2
1	6.814815	a	
3	7.166667		b
2	7.185185		b

V. DISCUSIÓN

En el presente estudio se determina que *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* son las bacterias frecuentemente aisladas de muestras de secreción de heridas, resultado que es coincidente con los reportados por Aguirre *et al.*, (1992), Perez *et al.*, (2012) y con Osorio *et al.*, (2015), esto se explica principalmente en la naturaleza de las muestras; así para el caso de *Staphylococcus aureus*, en esta investigación, las muestras se colectaron de heridas superficiales y al ser dicha bacteria parte de la flora normal superficial puede, desde las áreas no lesionadas, colonizar la piel y mucosas que presentan lesiones de continuidad.

En relación al aislamiento de *Escherichia coli* en la presente investigación, éste se realizó de muestras de secreción purulenta colectadas con jeringa, por tanto procedentes de heridas más profundas o de abscesos; al respecto, Sánchez y Saénz (2006) consideran que *E. coli* es poco común como parte de flora normal de la piel, por tanto su presencia en heridas está relacionada con infecciones mixtas, heridas contaminadas y abscesos.

Se demuestra el efecto inhibitorio de la miel de abeja procedente de las plantas de zapote y algarrobo y de la miel de abeja multifloral sobre *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. En relación a las especies bacterianas probadas los resultados coinciden con los obtenidos por Bason (2008) y Cruzado (2007) lo que se explica en general es que por el pH del producto que para el presente estudio fue de 5.0, en la disminución de la concentración de agua disponible para el microorganismo (A_w), y en la composición química que varía según la floración de la planta pero que con mayor frecuencia la representan flavonoides, fenoles y taninos.

Aun así el efecto difiere según la especie bacteriana utilizada, siendo la inhibición estadísticamente mayor sobre las cepas de *Staphylococcus aureus* que sobre las cepas de *Escherichia coli*, justificado en la estructura particular de ambas bacterias, así *Staphylococcus aureus* tiene una pared celular rica en peptidoglucano a través de la cual la miel difunde con mayor facilidad, mientras que *Escherichia coli* posee una pared celular con membrana externa rica en fosfolípidos y en polisacáridos lo que le confiere mayor hidrofobicidad y dificultad de emulsión respectivamente. Al respecto se coincide con los resultados de Aguilera (2009) quien incluso reporta que todas las cepas de *Staphylococcus aureus* probadas fueron inhibidas mientras que las de *Escherichia coli* resultaron ser resistentes.

Se reafirma la mayor sensibilidad a los diferentes tipos de miel, de las cepas de *Staphylococcus aureus* frente a las cepas de *Escherichia coli* aisladas de heridas superficiales, con los resultados de los antibiogramas aplicados a dichos microorganismos, así por ejemplo se ha obtenido una cepa de *Staphylococcus aureus* 100% sensible a todos los antibióticos probados y la cepas restantes con una sensibilidad variable, pero siempre mayor a la de las cepas de *Escherichia coli*. Así mismo se sustenta en la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los antibióticos, así la CMI de ampicilina para las cepas de *Staphylococcus aureus* es 8 $\mu\text{m/mL}$ y mayor a 16 $\mu\text{m/mL}$ para las cepas de *Escherichia coli* (Anexo 3, fig 9 y 10)

Así mismo, se guarda relación con las observaciones de Badet y Quero (2012) quien encontró que mieles de abeja a menores concentraciones de las utilizadas en esta investigación causaban efecto inhibitorio en cepas de microorganismos orales que incluían a *S. aureus* y *E. coli*. Se evidencia entonces, que aun dentro de una misma especie bacteriana su sensibilidad a productos como

la miel varía, entre otras razones, por el origen de las cepas, ya que en el presente estudio son provenientes de heridas por tanto con variaciones estructurales que contribuyen con su patogenicidad, mientras que los microorganismos probados por el autor en mención forman parte de la flora oral mixta.

En relación a la concentración se ha determinado estadísticamente que el efecto inhibitorio de la miel de abeja a concentración de 50%v/v y al de 100% es directamente proporcional a su concentración mientras que a concentraciones menores a 50%v/v el efecto inhibitorio no difiere; estos resultados son coincidentes con los obtenidos por Noaman *et al.*, (2015), Bason (2008), Cruzado (2007) y Fangio (2007) lo cual está respaldado, en este caso, por el hecho de que a mayor concentración del producto los factores como el pH, la disponibilidad acuosa y la composición química conservan con mayor eficacia sus propiedades antimicrobianas.

En la presente investigación se ha observado con las cepas de *Staphylococcus aureus* expuestas a la miel de abeja a concentración 100%, un doble halo de inhibición, uno que representa una inhibición total del crecimiento y otro de mayor diámetro que correspondería a una inhibición parcial; esto sugiere que la miel de abeja de la zona de Motupe puede tener un efecto bactericida y un efecto bacteriostático tal y como se demuestra en estudios como el de Fangio (2007) quien demostró efecto bacteriostático y bactericida de diferentes mieles en una cepa estándar de *E. coli* ATCC 25922.

Existe diferencia estadística en los resultados obtenidos con las diferentes tipos de miel lo cual se debe principalmente a la composición química de las mismas, así con la miel de zapote y de algarrobo el efecto inhibitorio fue igual entre ambas pero mayor que el de la miel multifloral, esto explicaría una composición

química y porcentual similar entre la miel de zapote y la de algarrobo, constituida principalmente por flavonoides, fenoles y taninos (Ochoa y Cedeño, 2015), sin embargo en el caso de la miel multifloral el contener derivados de plantas diferentes influye en la concentración de sus productos. Esto se relaciona con los estudios de Cooper *et al.*, (1999) y Aguilera *et al.*, (2009) quienes trabajaron diferentes tipos de miel, no encontrando diferencias entre el efecto inhibitorio de las mieles a pesar que la inhibición si dependía de la cepa probada.

En general, también se concuerda con Turcios (2007) que demostró que mieles de diferente procedencia no tienen el mismo efecto inhibitorio considerando que las propiedades de la miel de abeja dependen de sus características y éstas a su vez del tipo de suelo, humedad, planta, pigmentos florales y otros; sin embargo para el presente estudio esto no representa una variación puesto que las mieles empleadas todas provienen de la misma zona.

Considerando que la miel de abeja tiene una aplicación empírica curativa en heridas superficiales, con el presente estudio se demuestra que la eficacia de dicho producto en parte es debida al efecto inhibitorio sobre microorganismos patógenos.

VI. CONCLUSIONES

- Se identificó *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* en el 27.27% y 13.64% de heridas superficiales respectivamente.
- Las mieles de abeja de algarrobo y de zapote y la miel de abeja multifloral a concentraciones de 50% y 100% tienen efecto inhibitorio *in vitro* sobre *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* aisladas de heridas superficiales, siendo el efecto dependiente del tipo de miel y de la cepa probada y directamente proporcional a la concentración.
- El efecto inhibitorio *in vitro* de la miel de algarrobo y de la miel de zapote frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* es significativamente mayor que el efecto inhibitorio de la miel multifloral.
- El efecto inhibitorio *in vitro* de la miel de algarrobo, miel de zapote y miel multifloral es significativamente mayor frente a *Staphylococcus aureus* que frente a *Escherichia coli* aisladas de heridas superficiales.

VII. RECOMENDACIONES

- Realizar el estudio fitoquímico de la miel de abeja producida en la zona de Motupe, departamento de Lambayeque.
- Ejecutar estudios comparativos sobre el efecto de miel de abeja con otras especies de cepas patógenas
- Fomentar la investigación en diferentes tipos de miel de la región para determinar el efecto antibacteriano a fin de que se encuentren alternativas de tratamiento para afecciones causadas por microorganismos patógenos al ser humano.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilera G, Gil F, González AC, Nieves B, Rojas Y, Rodríguez A & Vit P. (2009). Evaluación de actividad antibacteriana de mieles de *Apis Mellifera* contra *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. En *Revista. Inst. Nac. Hig. "Rafael Rangel"*; 40 (1) pp.21-25.
- Aguirre, B. (1992) Infección de Heridas. En *Revista Chilena de Cirugía* 47 (6).pp615-621
- Alvitres, C. (2000). Planificación de la Investigación. Método Científico. Ed. Ciencia Chiclayo.pp205
- Bautista, R. (2011). *Efecto Antibacteriano de la Miel de Abeja en Diferentes concentraciones sobre Staphylococcus aureus*. (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional de Cajamarca
- Basson, J. & Sias, R. (2008). Antimicrobial activity of two South African honeys produced from indigenous *Leucospermum cardifolium* and *Erica* species on selected micro-organisms. En *Revista BMC Complementary and Alternative Medicine*, 8(41) pp.34-38
- Becerra.J, Cabrera. C, & Solano.M,. (2016). Efecto antibacteriano de la miel de abeja en diferentes concentraciones frente a *Staphylococcus aureus*. En *Revista Científica Ciencia Médica*, 19(2) pp.38-42
- Badec,C. & Quero,F. (2010). The *in vitro* effect of manuka honey on growth and adherence of bacteria. En *revista Journal of Biology*, 32(1) pp.59
- Cabrera, L., Ojeda, G., Céspedes, E. & Colina, A. (2003). Actividad Antibacteriana de la miel de abeja multiflorales (*Apis Mellifera Scutellana*) de cuatro zonas apícolas del Estado de Zulia, Venezuela. En *Revista Científica FCV – LUZ*, 13 (3) pp. 205-211
- Cruzado, L., Gutierrez, D. & Ruiz, S. (2007). Ensayo químico y efecto de antibiosis *in vitro* de la miel de abeja sobre microorganismos gram positivos y gram negativos. En *Revista Med. Vallejana*, 4 (2) pp. 95-105.
- Cooper, R., Molan, P & Harding, K. (1999). Antibacterial activity of honey against strains of *Staphylococcus aureus* from infected wounds. *Journal of the Royal Society of medicine*. En *Revista Royal Society of Medicine*, 92(1) pp.283 – 285.

- De la Rosa, M. & Prieto, J. (2010). *Microbiología en ciencias de la Salud*. (3.ed). España: El Sevier.
- Fangio, M., Iurlina, M. & Fritz, R. (2007) Actividad antimicrobiana de mieles del sudeste de la provincia de Buenos Aires frente a *Escherichia coli*. En *Revista Argentina de microbiología*, 39(2) pp.102-123
- Kinsbruy, D., Warner, G. & Seagel, G. (1991) *Manual de Microbiología Medica*. Orientación S.A. España. pp.222
- Lopez, F. & Lartchenko, S. (2006) *Skin and soft tissue infections*. Infectious disease clinics of North América, 20, pp. 759 – 772
- Noaman, M., Faid, M. & Adloumi, C. (2015). Antimicrobial Activited of Natural honey from. Aromatiz and Medicinal Plants on Antibio- resistat Strains of Bacteria. En *Revista En Revista International Journal Microbioly*. 27(1). pp. 77-82
- Osorio, R. & Alonso N. (2015). Prevalencia de la resistencia bacteriana en heridas quirúrgicas en el Hospital Central Militar, Mexico. En *Revista Sanid Milit*, 69(1), pp53-63
- Pérez, T., Sánchez A., Bautista, M. & Mendosa, D. (2012). Prevalencia de infección de heridas quirúrgicas, causas y resistencia a los fármacos en el Hospital General de Zona núm. 2 del IMSS, San Luis Potosí. En *Revistas de Especialidades Médico – Quirúrgicas*, 17(4) octubre-diciembre. pp. 261-265
- Ríos, V. & Boris L. (2001). *Producción y comercialización de la miel de abeja*. Lima: UNALM
- Sacsaquispe R y Velásquez J. (2002). *Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión*. Instituto nacional de salud. Lima.
- Sánchez, V. & Sáenz, E. (2006) Infecciones cutáneas bacterianas. En *Revista Dermatológica Peruana* 16 (1). pp. 7-20
- Turcios, J. (2007). *Evaluación del poder bactericida sobre Escherichia coli ATCC 25922, de cinco tipos de diferentes de miel de abeja existentes en Guatemala*. (Tesis de licenciatura). Universidad de Guatemala.
- Vera, A. (2014). *Características clínicas epidemiológicas de la infección de heridas quirúrgicas en pacientes postcesareadas en el servicio de ginecología del*

hospital regional de Cajamarca durante el periodo Enero 2012 hasta Diciembre 2013.(Tesis de licenciatura). Universidad Nacional de Cajamarca

ANEXOS

Anexo 1. Proceso y elaboración de la miel de abeja

Cuando una abeja regresa a la colmena, pasa el néctar que ha recolectado a sus propias compañeras del interior que aguardan junto a la piquera, y emprende de nuevo el vuelo en busca de más néctar. Las abejas del interior, dan inicio inmediatamente a un proceso de transformación del néctar en miel. Para ello alargan la trompa y sacan una gotita del líquido que llenaba su buche, la cual se desliza por la lengua estirada. Este proceso es realizado por muchas abejas en varios minutos, pasándose las gotitas del néctar (enriquecido con enzimas segregados por ellas mismas) de abeja en abeja, iniciando así el proceso de conversión de néctar a miel.

El producto se almacena en las celdillas, concentrándose aún más por medio del sistema de ventilación de la colmena. Posteriormente cada celdilla es cerrada herméticamente con cera con el fin de evitar que se reabsorba el agua del medio y no se fermente. Hasta aquí el proceso de elaboración de la miel, la cual es extraída en los panales por los apicultores, que depositan en centrifugadoras una vez extraída la cera y otras sustancias como el propóleo, luego se extrae esta miel que pasa por un filtro y se envasa. (González, 1995; Ríos, 2001)

Anexo 2. Identificación de especies aisladas de las heridas purulentas.



Figura 8. Identificación bioquímica y antibiograma de especies aisladas realizado en equipo Microscan

Anexo 3. Antibiograma y CMI para *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*

Fecha de naci...			
Méd resp			
1	Staphylococcus aureus		
1	S. aureus		
Antimicrobiano	CIM	Interps	Origen
Amox/A Clav	<=4/2	S	
Amp/Sulbactam	>16/8	R	
Ampicilina	>8	BLAC	
Cefazolina	<=4	S	
Ciprofloxacina	<=1	S	
Clindamicina	<=0.5	S	
Daptomicina	<=0.5	S	
Eritromicina	<=0.5	S	
Gentamicina	<=4	S	
Levofloxacina	<=1	S	
Línezolid	<=1	S	
Moxifloxacina	<=0.5	S	
Nitrofurantoina	<=32		
Oxacilina	<=0.25	S	
Penicilina	>8	BLAC	
Rifampicina	<=1	S	
Screening de C...	<=4	NEG	
Synercid	<=1	S	
Tetraciclina	<=4	S	
Trimet/Sulfa	>2/38	R	
Vancomicina	<=0.25	S	

Figura 9. Antibiograma para la cepa N°3 de *S. aureus*

Fecha de naci...			
Méd resp			
1	Escherichia coli		
1	E. coli		
Antimicrobiano	CIM	Interps	
Amicacina	<=16	S	
Amox/A Clav	>16/8	R	
Amp/Sulbactam	>16/8	R	
Ampicilina	>16	R	
Cefazolina	>16	R	
Cefepima	<=4	S	
Cefotaxima	<=2	S	
Cefotaxima/A Clavulánico	<=0.5		
Ceftazidima	<=1	S	
Ceftazidima/A Clavulánico	<=0.25		
Ceftriaxona	<=8	S	
Cefuroxima	>16	R	
Ciprofloxacina	<=1	S	
Ertapenem	<=2	S	
Gentamicina	>8	R	
Imipenem	2	S	
Levofloxacina	<=2	S	
Meropenem	<=1		
Moxifloxacina	4		
Nitrofurantoina	64	I	
Pip/Tazo	<=16	S	
Tetraciclina	>8	R	
Ticar/A Clav	<=16	S	
Tobramicina	8	I	
Trimet/Sulfa	>2/38	R	

Figura 10. Antibiograma para la cepa N°1 de *E. coli*

Anexo 4. Prueba de significación de Tukey (0.05) del efecto inhibitorio *in vitro* de miel de abeja sobre *Staphylococcus aureus* según concentración y tipo de miel

Concentración	Miel	Halo	1	2	3	4
10	ALG	6.00000	a			
10	ZAP	6.00000	a			
10	MUL	6.00000	a			
20	ALG	6.00000	a			
20	ZAP	6.00000	a			
20	MUL	6.00000	a			
30	ALG	6.00000	a			
30	ZAP	6.00000	a			
30	MUL	6.00000	a			
40	ALG	6.00000	a			
40	ZAP	6.00000	a			
40	MUL	6.00000	a			
50	MUL	6.00000	a			
50	ZAP	16.55556		b		
50	ALG	16.66667		b		
100	MUL	16.88889		b		
100	ZAP	19.22222			c	
100	ALG	21.33333				d

Anexo 5. Prueba de significación de Tukey (0.05) del efecto inhibitorio *in vitro* de miel de abeja sobre *Staphylococcus aureus* según concentración y cepa.

Concentración	cepa	halo	1	2	3	4	5	6	7
10	1	6.00000	a						
10	2	6.00000	a						
10	3	6.00000	a						
10	4	6.00000	a						
10	5	6.00000	a						
10	6	6.00000	a						
20	1	6.00000	a						
20	2	6.00000	a						
20	3	6.00000	a						
20	4	6.00000	a						
20	5	6.00000	a						
20	6	6.00000	a						
30	1	6.00000	a						
30	2	6.00000	a						
30	3	6.00000	a						
30	4	6.00000	a						
30	5	6.00000	a						
30	6	6.00000	a						
40	1	6.00000	a						
40	2	6.00000	a						
40	3	6.00000	a						
40	4	6.00000	a						
40	5	6.00000	a						
40	6	6.00000	a						
50	1	12.44444		b					
50	3	13.00000		b	c				
50	5	13.11111		b	c				
50	4	13.11111		b	c				
50	2	13.22222		b	c				
50	6	13.55556			c				
100	4	18.22222				d			
100	3	18.55556				d	e		
100	1	18.88889				d	e	f	
100	6	19.33333					e	f	g
100	5	19.66667						f	g
100	2	20.22222							g

Anexo 6. Prueba de significación de Tukey (0.05) del efecto inhibitorio *in vitro* de miel de abeja sobre *Staphylococcus aureus* según tipo de miel y cepa.

Miel	cepa	halo	1	2	3	4
MUL	3	7.55556	a			
MUL	6	7.77778	a			
MUL	1	7.83333	a			
MUL	4	7.83333	a			
MUL	5	7.88889	a			
MUL	2	8.00000	a			
ZAP	1	9.50000		b		
ALG	4	9.77778		b	c	
ZAP	6	10.00000		b	c	e
ZAP	3	10.00000		b	c	e
ZAP	4	10.05556		b	c	e
ZAP	2	10.11111		b	c	e
ZAP	5	10.11111		b	c	e
ALG	3	10.22222			c	e
ALG	1	10.33333			c	e
ALG	5	10.38889			c	e
ALG	2	10.61111				e
ALG	6	10.66667				e

Anexo 7. Prueba de significación de Tukey (0.05) del efecto inhibitorio *in vitro* de miel de abeja sobre *Escherichia coli* según tipo de miel y concentración.

Concentración	MIEL	HALO	1	2	3
10	ALG	6.00000	a		
10	ZAP	6.00000	a		
10	MUL	6.00000	a		
20	ALG	6.00000	a		
20	ZAP	6.00000	a		
20	MUL	6.00000	a		
30	ALG	6.00000	a		
30	ZAP	6.00000	a		
30	MUL	6.00000	a		
40	ALG	6.00000	a		
40	ZAP	6.00000	a		
40	MUL	6.00000	a		
50	MUL	6.00000	a		
50	ALG	8.11111		b	
50	ZAP	8.11111		b	
100	MUL	10.55556			c
100	ZAP	10.77778			c
100	ALG	11.44444			c

Anexo 8. Prueba de significación de Tukey (0.05) del efecto inhibitorio *in vitro* de miel de abeja sobre *Escherichia coli* según tipo de cepa y concentración.

Concentración	CEPA	HALO	1	2	3	4
10	1	6.00000	a			
10	2	6.00000	a			
10	3	6.00000	a			
20	1	6.00000	a			
20	2	6.00000	a			
20	3	6.00000	a			
30	1	6.00000	a			
30	2	6.00000	a			
30	3	6.00000	a			
40	1	6.00000	a			
40	2	6.00000	a			
40	3	6.00000	a			
50	1	7.33333		b		
50	3	7.44444		b		
50	2	7.44444		b		
100	1	9.55556			c	
100	3	11.55556				d
100	2	11.66667				d