

UNIVERSIDAD SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA
PROGRAMA EXPERIENCIAS DOCENTES CON LA COMUNIDAD –EDC-
SUBPROGRAMA EDC DE BIOLOGÍA

INFORME FINAL DE LA PRACTICA DE EDC
LABORATORIO DE ENTOMOLOGÍA APLICADA Y PARASITOLOGÍA
ENERO 2003 - ENERO 2004

Br. MARÍA JOSÉ DARDÓN PERALTA

Supervisora EDC: Licda. MARÍA EUNICE ENRÍQUEZ
Asesora Institucional: Licda. ANTONIETA RODAS RETANA

VoBo. _____

INDICE

INTRODUCCIÓN	4
CUADRO RESUMEN DE LAS ACTIVIDADES DE EDC	5
ACTIVIDADES REALIZADAS DURANTE LA PRACTICA DE EDC	7
ACTIVIDADES DE SERVICIO	5
ACTIVIDADES DE DOCENCIA	7
ACTIVIDADES DE INVESTIGACIÓN	10
ANEXOS	14

INTRODUCCIÓN

El presente informe es el resultado del Programa de Experiencias Docentes con la Comunidad -EDC- de la Escuela de Biología, realizado durante el año 2003, tiene como objetivo primordial la presentación de las actividades realizadas durante esta práctica, se incluyen actividades de docencia y servicio, así como un proyecto de investigación, realizados en el Laboratorio de Entomología Aplicada y Parasitología -LENAP- de la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala. Se realizó el EDC Integrado que tiene como objetivo primordial el proporcionar servicios de docencia, investigación y/o extensión a instituciones relacionadas con el campo de las ciencias biológicas, además de consolidar en el estudiante la conciencia conservacionista de las especies y sus hábitats.

Durante la ejecución del Programa de EDC se realizaron actividades relacionadas al cuidado de chinches (*Triatoma dimidiata*), que son los organismos con los que se trabaja principalmente en el laboratorio, como parte de una serie de proyectos, que incluyen actividades de morfometría, técnicas de biología molecular, control biológico. Un área nueva en el laboratorio es el que se lleva a cabo con abejas sin aguijón, área que se encuentra bien desarrollada y que presenta una gran alternativa para la realización de actividades de servicio, docencia e investigación; la misma cuenta con un Meliponario ubicado en el Jardín Botánico, que facilita la realización de actividades prácticas. Además existen varios proyectos lo que permiten giras de campo y docencia directa con comunidades.

CUADRO RESUMEN DE LAS ACTIVIDADES DE EDC

PROGRAMA UNIVERSITARIO	NOMBRE DE LA ACTIVIDAD	FECHA DE LA ACTIVIDAD	HORAS DE EDC ASIGNADAS
A. SERVICIO	Limpieza de Bioterio	Año 2003/ 1 * 15 días	92
A. SERVICIO	Manejo de Chinchas	Año 2003/ 1 * semana	100
A. SERVICIO	Cuidado de Meliponario	Año 2003/ 1 * 15 días	80
A. SERVICIO	BIGUA	Marzo 2003	60
A. SERVICIO	Colecta y Montaje de Abejas	4-7 de marzo 2003 y 1-4 de diciembre del 2003	180
B: DOCENCIA	Hongos Entomopatógenos	Periódicamente	10
B: DOCENCIA	Meliponicultura: Biología y Manejo de Abejas sin Aguijón	5-6 noviembre 2003 Tapachula, México	16
B: DOCENCIA	III Seminario Mesoamericano sobre abejas sin aguijón	Tapachula, México 6-8 noviembre 2003	24
B: DOCENCIA	Taller: Meliponicultura	Mayo	60
B: DOCENCIA	Técnicas de Biología Molecular	1/15 días Febrero-Abril	25
B: DOCENCIA	Seminario: Patología de Artrópodos	20 de febrero 2003	4
B: DOCENCIA	Serología	Octubre	4
B: DOCENCIA	Identificación de Abejas	4-8 de marzo del 2003	50
B. DOCENCIA	Seminario de Apicultura y Feria de la Miel	16 de febrero del 2003	6
C. INVESTIGACIÓN	Determinación de la efectividad antibacteriana de la miel de <i>Apis mellifera</i> , <i>Melipona beecheii</i> y <i>Tetragonisca angustula</i> sobre cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> in vitro.	Marzo a noviembre del 2003	470

Total de horas: 1181

ACTIVIDADES REALIZADAS DURANTE LA PRÁCTICA DE EDC

ACTIVIDADES DE SERVICIO:

Actividad No. 1: *LIMPIEZA DE BIOTERIO*

OBJETIVOS: Dar mantenimiento a las instalaciones del Bioterio del LENAP y cuidado de ratones para el desarrollo de investigaciones.

PROCEDIMIENTO: Una vez cada quince días se realiza el proceso de limpieza del Bioterio, para ésto se inicia limpiando las cajas donde se encuentran los ratones, se procede a colocar viruta y concentrado en cajas limpias, luego se toma al ratón de la cola y se coloca en la caja limpia, se le coloca una pacha con agua limpia. A la caja sucia se le retira la viruta sucia y se lava con agua y jabón. Se barre el área y se ordena el material que se encuentra en las instalaciones del Bioterio. Esta actividad se realizó cada quince días, sin embargo durante el año también se realizó una limpieza más profunda, en la que se desechó el material vencido, se realizó un inventario de las cajas presentes en el Bioterio, en las cuales se alimentan las chinches y se colocan los ratones, así mismo se incluyó en la limpieza las oficinas del LENAP, en esta actividad participó todo el personal del laboratorio.

RESULTADOS: Se contribuyó al mantenimiento del orden y la limpieza de las instalaciones del Bioterio. Así como a mantener a los ratones en las condiciones adecuadas para su reproducción y sobrevivencia.

LIMITACIONES O DIFICULTADES PRESENTADAS: Al inicio de esta actividad se contaba con poca destreza para el cambio de ratones de caja sucia a caja limpia, pero con las instrucciones y práctica se logro superar.

Actividad No. 2: *MANEJO DE CHINCHES*

OBJETIVOS: Colaborar con las actividades que se realizan en el Laboratorio de Entomología Aplicada y Parasitología -LENAP- para conservar el material biológico existente, que básicamente consiste en chinches de distintos sitios del país.

PROCEDIMIENTO: En el manejo de chinches se realizaron las siguientes actividades:

a) Preservación del material colectado en giras de campo; para ésto se coloca la chiche muerta en una solución de alcohol-glicerina, se coloca, dentro del frasco, un número de inventario escrito en un papel, luego se rotula el frasco con marcador indeleble, los datos de colecta de la chiche se anotan en un cuaderno de control, donde se lleva el registro de todas las chinches que ingresan a la colección del Laboratorio.

b) Alimentación de las chinches que se encuentran en el Bioterio. Estas son utilizadas para la realización de los diferentes ensayos biológicos, como parte de los proyectos que se ejecutan en el Laboratorio. Para ésto se toma un ratón, se coloca dentro de una rejilla de malla metálica elaborada especialmente para esta actividad, se acomoda el ratón para que éste no se pueda mover, luego se colocan las chinches en la caja plástica y se introduce el ratón en la caja, se deja por dos horas para que las chinches se alimenten y el ratón no muera.

c) Elaboración de etiquetas para la identificación de chinches. Esta es una de las actividades que requiere menos tiempo debido a que el material biológico prefiere preservarse utilizando alcohol-glicerina, lo cual es importante para la realización de investigaciones posteriores que incluyen técnicas de PCR y morfometría. Las etiquetas incluyen los datos necesarios para la identificación de chinches colectadas.

RESULTADOS: Se ingresaron chinches a la colección, se mantuvieron vivos los cultivos de chinches, los cuales fueron utilizados en la realización de bioensayos del Proyecto de Hongos Entomopatógenos. Se elaboraron etiquetas de las chinches que se encuentran en las colecciones de exposición del laboratorio, y se ordenó el material biológico.

LIMITACIONES O DIFICULTADES PRESENTADAS: Entre las limitaciones presentadas durante la realización de la actividad se presentó el desconocimiento de los estadios de las chinches, información necesaria para su ingreso en la colección, para superar esta dificultad se recibió la docencia necesaria.

Actividad No. 3 : *CUIDADO DE MELIPONARIO*

OBJETIVOS: Dar mantenimiento a las colmenas de abejas sin aguijón, presentes en el Meliponario, además de contribuir con las condiciones idóneas para el buen funcionamiento del mismo.

PROCEDIMIENTO: Asistir al Meliponario una vez cada quince días para alimentar a las abejas sin aguijón., para esto se utiliza miel de venta comercial, se coloca en recipientes y se introducen dentro de las cajas donde se encuentran las colmenas. Otra actividad realizada en el Meliponario consiste en contar el tamaño de las poblaciones, número de reservas alimenticias, tamaño del nido, etc., para esto se procede a abrir la caja en donde se encuentra la colonia, se deposita alimento, se anotan los datos en una boleta para llevar un control de la cantidad de alimento requerido, se cuenta la población de abejas y las reservas alimenticias, se toman las medidas del nido utilizando una cinta métrica, todos estos datos se anotan en una hoja de registro y posteriormente se ingresan a una base de datos para su análisis.

RESULTADOS: Se contribuyó al mantenimiento de las colmenas existentes en el Meliponario, además de generar información de las condiciones de las colmenas de abejas nativas presentes en el Meliponario.

LIMITACIONES O DIFICULTADES PRESENTADAS: No se presentó ninguna dificultad en la realización de la actividad, sin embargo, vale la pena hacer notar que el Meliponario se ubica en la zona 10, lo que hace que la actividad consuma mas tiempo del previsto, pues la mayoría de actividades se realizaban en la Ciudad Universitaria, zona 12 y en la movilización entre ambos lugares se invierte mucho tiempo.

Actividad No. 4: *BIGUA*

OBJETIVOS: Contribuir a las actividades realizadas en el Herbario BIGUA, ubicado en la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

PROCEDIMIENTO: Se realizaron actividades como el de montar las plantas para lo cual se utilizaba goma o hilo, y así asegurar la planta al cartón. Luego de estar montadas y etiquetadas se procede a incluirlas en el inventario del Herbario, en el cual se anotan los datos de colecta de la planta, se les designa un número correlativo, el cual se anota en el cartón de la planta y que corresponde al del inventario. Ya ingresada la planta en el inventario esta es intercalada en las colecciones del Herbario, donde existen carpetas para cada planta, en los casos en que fuera un nuevo ingreso de especie, es necesario crear nuevas carpetas. Además se de servicio a personas que llegan a realizar consultas al Herbario.

RESULTADOS: Se contribuyó al montaje, inventario e intercalamiento de las plantas presentes en el Herbario BIGUA.

LIMITACIONES O DIFICULTADES PRESENTADAS: No se presentó ninguna dificultad en el desarrollo de esta actividad.

Actividad No. 5: *COLECTA Y MONTAJE DE ABEJAS*

OBJETIVOS: Colectar, montar y elaborar etiquetas de abejas sin aguijón para la colección de abejas sin aguijón presentes en el Laboratorio de Entomología Aplicada y Parasitología –LENAP-.

PROCEDIMIENTO: Durante el año 2003 se realizaron dos giras de campo a el Trifinio, Chiquimula con el objetivo de conocer la diversidad de abejas sin aguijón en esta área, como parte de un proyecto de investigación que se desarrolla en el Laboratorio. Para esto se marcaron puntos de muestreo utilizando GPS y con una red se colectaron organismos vivos, también se utilizaron atrayentes para la colecta de abejas. Los organismos colectados se colocaron en una cámara con cianuro, para después montarlos con las anotaciones correspondientes a los datos de colecta. En el laboratorio se realizaron las etiquetas de las abejas colectadas, designándoles un número correlativo que corresponde al número de colecta, sitio y fecha, las etiquetas son impresas, cortadas y se monta cada espécimen con su etiqueta para posteriormente ser identificado.

Además se realizó un listado de las abejas presentes en el Museo de Historia Natural para conocer la diversidad de abejas en el país y dejar una base de esta información en el Laboratorio. Se realizaron etiquetas para reemplazar las dañadas y se montaron de nuevo los especímenes.

RESULTADOS: Se elaboraron las etiquetas de las abejas que se han colectado en el área del Trifinio, Chiquimula y en el Museo de Historia Natural. Se elaboró un listado de la variedad de abejas presentes en ambos lugares, con lo que se obtiene un listado preliminar de las abejas sin aguijón presentes en Guatemala.

LIMITACIONES O DIFICULTADES PRESENTADAS: No se presentó ninguna dificultad en la realización de la actividad.

ACTIVIDADES DE DOCENCIA:

Actividad No. 1: *HONGOS ENTOMOPATOGENOS*

OBJETIVOS: Conocer las técnicas utilizadas para el aislamiento de hongos entomopatógenos presentes en chinches, cultivo de hongos, realización de bioensayos y manejo de equipo.

PROCEDIMIENTO: En el laboratorio se llevó a cabo en el año 2003 un proyecto de investigación de control biológico de chinche utilizando hongos entomopatógenos, en el cual participé realizando actividades para conocer las técnicas empleadas para trabajar con ellos. Para seleccionar un hongo entomopatógeno es necesario trabajar en un área estéril, se toma una pequeña muestra de los hongos presentes en las cajas de Petri, donde se encuentra una chinche muerta que presenta hongos que están esporulando, utilizando un asa de cobre, la muestra se coloca en un porta objetos para observar en microscopio el tipo de hongo presente en el cultivo identificándolo, luego se clasifica como un hongo entomopatógeno o no. Si este es entomopatógeno se realiza un nuevo cultivo en otra caja de Petri con medio de cultivo, se realizan aislamientos para asegurarse de obtener un cultivo puro. El cultivo puro es refrigerado y se mantiene por dos o tres meses, posterior a este período el hongo debe ser revigorizado.

RESULTADOS: Obtener información y desarrollo de destrezas para la aplicación de las técnicas de laboratorio empleadas para el aislamiento de hongos entomopatógenos.

LIMITACIONES O DIFICULTADAS PRESENTADAS: No se presentó ninguna dificultad en el desarrollo de la actividad.

Actividad No. 2 :

MELIPONICULTURA: BIOLOGÍA Y MANEJO DE ABEJAS SIN AGUIJÓN

OBJETIVOS: Obtener conocimientos técnicos sobre su manejo y su propagación.

PROCEDIMIENTO: Asistir al taller impartido por el Colegio de la Frontera Sur, en Tapachula, México. Se obtuvo información sobre las generalidades de las abejas sin aguijón, posteriormente se realizó la parte práctica, en la que se incluyeron actividades como la realización de trampas para fóridos utilizando vinagre, la fabricación de dispensadores de alimento utilizando jeringas, división de colmenas y reconocimiento de colmenas débiles.

RESULTADOS: Obtener información sobre la biología, biodiversidad, manejo tecnificado de las abejas sin aguijón, características de la miel de meliponinos y perspectivas futuras de la Meliponicultura en la región Mesoamericana.

LIMITACIONES O DIFICULTADES PRESENTADAS: No se presentó ninguna dificultad.

Actividad No. 3: *III SEMINARIO MESOAMERICANO SOBRE ABEJAS SIN AGUIJÓN*

OBJETIVOS: Adquirir información científica reciente sobre el tema de las abejas sin aguijón.

PROCEDIMIENTO: Asistir a las conferencias realizadas en el Seminario realizado en Tapachula, Chiapas, México, en las cuales se presentaron temas relacionados con etnobiología, reproducción y genética de abejas sin aguijón, control de plagas, comportamiento social, entre otros temas.

RESULTADOS: Se obtuvo información de los proyectos realizados recientemente en la región del trópico relacionados a las abejas sin aguijón.

LIMITACIONES O DIFICULTADES: Del total de presentaciones no fue posible participar en las últimas tres, debido a posibles problemas de transporte en el retorno México-Guatemala.

Actividad No. 4: *TALLERES DE MELIPONICULTURA*

OBJETIVOS: Preparar talleres sobre la biología de las abejas sin aguijón, técnicas de crianza y manejo de colmenas, además de participar en los talleres realizados en Pueblo Nuevo Viñas, Santa Rosa., dirigido a meliponicultores del área.

PROCEDIMIENTO: Buscar y seleccionar la información que se presentaría en los talleres, para esto se consultó la bibliografía presente en el Laboratorio y de consultas al Internet. Luego se elaboró un bosquejo de la información a presentar y se realizó la presentación en Power Point. Se preparó material didáctico para las charlas que incluían la fabricación de potes de cera y elaboración de carteles.

RESULTADOS: Se participó en los talleres que se realizaron en Pueblo Nuevo Viñas, Santa Rosa, donde se tuvo la oportunidad de desarrollar docencia directa con los asistentes al taller, siendo ellos meliponicultores y jóvenes estudiantes.

LIMITACIONES O DIFICULTADES PRESENTADAS: No se presentó ninguna dificultad en el desarrollo de esta actividad.

Actividad No. 5: *TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR*

OBJETIVOS: Desarrollar destrezas para la utilización de la Biología Molecular como una herramienta en la realización de proyectos de investigación.

PROCEDIMIENTO: Participar en las actividades que se realizan en el Laboratorio en la que se extrae ADN de las patas de chinches por medio de la técnica de maceración, replicación de ADN, montaje de geles para observar las bandas de ADN por la aplicación de electroforesis.

RESULTADOS: Obtener habilidades para el manejo de técnicas utilizadas en Biología Molecular.

LIMITACIONES O DIFICULTADAS PRESENTADAS: No se presento ninguna dificultad

Actividad No. 6 *SEMINARIO PATOLOGÍA DE ARTROPODOS*

OBJETIVOS: Conocer la utilización de medios biológicos para el control de plagas.

PROCEDIMIENTO: Participación en el seminario-taller realizado en la Facultad de Agronomía el día 20 de febrero del año 2003.

RESULTADOS: Conocer las diferentes enfermedades que afectan a los artrópodos y que pueden ser utilizadas para su control biológico.

LIMITACIONES O DIFICULTADAS PRESENTADAS: No se presentó ninguna dificultad.

Actividad No. 7: *SEROLOGÍA*

OBJETIVOS: Conocer técnicas para la extracción de sangre y el manejo de muestras.

PROCEDIMIENTO: Asistir al curso dado por la Licenciada Antonieta Rodas impartido en el Laboratorio de Entomología Aplicado y Parasitología, el día 13 de octubre del 2003. Se reconocieron los distintos preservantes para el manejo de las muestras de sangre tomadas con vacutainer según el tipo de análisis que se realizará a la muestra, y los métodos de extracción de sangre (intravenoso y punción del dedo). Además se recibió información sobre el cuidado y manejo de las muestras de sangre, las cuales deben ser almacenadas a cierta temperatura según los análisis que se necesiten.

RESULTADOS: Se conoció las técnicas de extracción y manejo de muestras de sangre.

LIMITACIONES O DIFICULTADES PRESENTADAS: No se presentó ninguna dificultad.

Actividad No. 8 : *IDENTIFICACIÓN DE ABEJAS SIN AGUIJÓN*

OBJETIVOS: Desarrollar habilidades en la determinación taxonómica de las abejas sin aguijón que se encuentran en las diferentes colecciones del Laboratorio.

PROCEDIMIENTO: Periódicamente se realizó la identificación de abejas sin aguijón, se utilizó la clave taxonómica elaborada y proporcionada por el Doctor Ayala, utilizando un estereoscopio y pinzas para identificar las abejas. Se realizó nuevas etiquetas con la información completa de cada espécimen.

RESULTADOS: Adquisición de destrezas en la identificación de abejas sin aguijón, además de dar servicio al laboratorio al contribuir con la determinación taxonómica de las abejas sin aguijón presentes en el Laboratorio.

Actividad No. 9: *SEMINARIO DE APICULTURA Y FERIA DE LA MIEL*

OBJETIVOS: Obtener información acerca de las abejas con y sin aguijón, además de conocer los productos de la colmena y sus utilidades

PROCEDIMIENTO: Asistir al Seminario realizado en la Facultad de Veterinaria y Zootecnia de la Universidad de San Carlos de Guatemala el día 16 de mayo del 2003.

RESULTADOS: Conocer generalidades acerca del estudio de las abejas, tanto de las abejas sin aguijón como de *Apis mellifera*. Además de conocer las técnicas empleadas para el manejo de colmenas y sus productos.

LIMITACIONES O DIFICULTADES PRESENTADAS: No se presentó ninguna dificultad.

ACTIVIDADES DE INVESTIGACIÓN:

“DETERMINACIÓN DE LA EFECTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LA MIEL DE *APIS MELLIFERA*, *MELIPONA BEECHEII* Y *TETRAGONISCA ANGUSTULA* SOBRE CEPAS DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ATCC 25923 IN VITRO”

Actividad No. 1: *ELABORACIÓN DE PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN*

OBJETIVOS: Obtener información acerca de las técnicas empleadas para pruebas de susceptibilidad con antibióticos, manejo de cultivo de bacterias y las técnicas de laboratorio para la correcta elaboración de la investigación.

PROCEDIMIENTO: Búsqueda de información en biblioteca de la Universidad de San Carlos y de La Universidad del Valle, consultas con Licenciado Pedro Liska, Licenciada María del Carmen Bran. Licenciada Carmen Yurrita y Licenciada Patricia Vit (vía correo electrónico), así como uso de Internet para la colecta de información. Luego se elaboró el protocolo de investigación consultando al asesor de EDC Licenciada Eunice Enríquez. Obtención de gran parte de material bibliográfico.

RESULTADOS: Protocolo de investigación.

LIMITACIONES O DIFICULTADES PRESENTADAS: Poca información acerca de la metodología adecuada para las pruebas de laboratorio utilizando miel.

Actividad No. 2 *COLECTA DE MUESTRAS*

OBJETIVOS: Obtener las tres distintas muestras de miel que serían utilizadas en el laboratorio.

PROCEDIMIENTO: La miel de *Apis mellifera* fue comprada, siendo su origen de la Costa Sur de Guatemala. La miel de *Tetragonisca angustula* se obtuvo por medio de extracciones utilizando una jeringa y la miel fue succionada de los potes de miel, de una colmena en caja, ubicada en el Meliponario del Jardín Botánico, durante el mes de junio del 2003, la miel fue depositada en frascos color ámbar para evitar la alteración de la miel por exposición lumínica. La miel de *Melipona beecheii* utilizada se encontraba en el Laboratorio de una colecta realizada en el año 2000 en Pueblo Nuevo Viñas.

RESULTADOS: Se obtuvieron las tres muestras de miel de las abejas, para realizar la fase experimental.

LIMITACIONES O DIFICULTADES PRESENTADAS: Para realizar una comparación entre las tres especies de abejas es necesario que las muestras de miel fueran procedentes de un mismo sitio geográfico, de la misma fecha y que las colmenas se encontraran en las mismas condiciones, esto no fue posible, así que se utilizaron muestras de miel independientes.

Actividad No. 3 : *OBTENCIÓN DE CEPA DE STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

OBJETIVOS: Obtener la bacteria que sería utilizada en la fase experimental.

PROCEDIMIENTO: Se hicieron los contactos para la donación de una cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 con la sección de Microbiología del Laboratorio Clínico Popular –LABOCLIP- de la Universidad de San Carlos de Guatemala, quienes brindaron la cepa.

RESULTADOS: Se obtuvo la cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 que fue utilizada en la fase experimental.

LIMITACIONES O DIFICULTADES PRESENTADAS: No se presentó ninguna dificultad.

Actividad No. 4: *PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVOS*

OBJETIVOS: Preparar los medios de cultivos necesarios para la prueba de susceptibilidad.

PROCEDIMIENTO: En un laboratorio clínico privado se preparó el Agar Mueller-Hinton, según especificaciones del fabricante, se dejó enfriar y se vertió el agar a las cajas de Petri desechables donde se dejaron reposar hasta solidificar. Luego se mantuvieron en refrigeración hasta que fueron utilizadas.

RESULTADOS: Se prepararon 60 cajas de Petri con Agar Mueller- Hinton.

LIMITACIONES O DIFICULTADES PRESENTADAS: No se presentó ninguna dificultad en la elaboración de las mismas.

Actividad No. 5: *PREPARACIÓN DE DILUCIONES*

OBJETIVOS: Realizar tres diluciones distintas de las tres muestras de miel, a fin de comparar la actividad antibacteriana.

PROCEDIMIENTO: Utilizando agua destilada y una micropipeta se realizaron diluciones al 25%, 50% y 75 % de las tres muestras de mieles. Para diluir la muestra de miel de *Apis mellifera* fue necesario calentarla en baño maría, debido a que esta miel presentó mayor viscosidad y no era posible tomarla con la micropipeta al tomar la cantidad de miel necesaria para diluir con agua destilada. Se controló la temperatura, la cual se mantuvo alrededor de los 40 grados centígrados, con el fin de evitar que los componentes presentes en la miel fuesen alterados.

RESULTADOS: Se obtuvieron las tres diluciones deseadas de cada tipo de miel.

LIMITACIONES O DIFICULTADES PRESENTADAS: No se presentó ninguna dificultad.

Actividad No. 6 : *DETERMINACIÓN DE LA HUMEDAD DE LAS MUESTRAS DE MIEL*

OBJETIVOS: Conocer por lo menos una propiedad fisico-química de las mieles utilizadas

PROCEDIMIENTO: Las muestras de miel fueron analizadas utilizando un refractómetro, el cual fue proporcionado por el Departamento de Fisicoquímica de la Escuela de Química, se obtuvieron los grados brix, a los cuales posteriormente se les hizo la conversión para determinar la humedad presente.

RESULTADOS: Se obtuvo los datos de la humedad presente en cada muestra de miel colectada.

LIMITACIONES O DIFICULTADES PRESENTADAS: Falta de experiencia en el uso de un refractómetro, situación que fue resuelta con la asesoría del Licenciado Abraham Vásquez.

Actividad No. 7: *CULTIVO DE BACTERIAS*

OBJETIVOS: Preparar una solución de bacterias de *S. aureus* para la prueba de susceptibilidad.

PROCEDIMIENTO: Se preparó una solución de bacterias utilizando una asa bacteriológica, se tomó un grupo de bacterias *S. aureus* el cual se sumergió en solución salina contenida en un tubo de ensayo. La solución se compara con un estándar de Macfarland 0.5 y al ser estas iguales, la concentración de nuestra solución era ya conocida.

RESULTADOS: Se obtuvo una solución de bacterias para la siembra en las cajas de Petri.

LIMITACIONES O DIFICULTADES PRESENTADAS: La comparación del estándar de Macfarland con la solución preparada esta sujeta a error, debido a que las soluciones son sometidas a una comparación visual, por lo que pueden parecer iguales y no serlo exactamente, además al realizar réplicas la concentración de bacterias no será la misma en todas las soluciones por lo que en cada réplica se siembra distinta cantidad de bacterias.

Actividad No. 8: *SATURACIÓN DE DISCOS*

OBJETIVOS: Saturar los discos a utilizar para realizar la prueba de susceptibilidad.

PROCEDIMIENTO: Los discos de papel, previamente elaborados utilizando papel filtro y esterilizados, fueron saturados con las diferentes diluciones de miel utilizando una micropipeta. Los discos fueron manipulados utilizando pinzas estériles.

RESULTADOS: Se saturaron los discos necesarios para la prueba de susceptibilidad.

LIMITACIONES O DIFICULTADES PRESENTADAS: No se presentó ninguna limitación.

Actividad No. 9: *PRUEBA DE SUSCEPTIBILIDAD*

OBJETIVOS: Determinar la actividad antibacteriana de las muestras de miel.

PROCEDIMIENTO: Con la solución de bacterias preparada, se realizó una siembra en tres direcciones utilizando un hisopo estéril, se esperó un tiempo aproximado de 2 minutos y se colocaron los discos saturados en la caja de Petri. Las cajas fueron incubadas a 35 grados centígrados durante 24 horas. Después de este tiempo se midió el halo de inhibición utilizando una regla milimétrica.

RESULTADOS: Se obtuvo los datos de halos de inhibición de las muestra de miel.

LIMITACIONES O DIFICULTADES PRESENTADAS: Una limitación presentada fue la falta de una campana de flujo laminar que permitiera trabajar en un ambiente estéril, que permitiera trabajar sin contaminaciones por hongos oportunistas.

Actividad No. 10: *ANÁLISIS DE DATOS*

OBJETIVOS: Realizar análisis estadísticos de los datos.

PROCEDIMIENTO: Se realizó un análisis descriptivo y una prueba binomial, para lo cual se clasificaron los resultados obtenidos como: positiva (inhibición) y negativas (no inhibición).

RESULTADOS: La dilución de *Tetragonisca angustula* y *Melipona beecheii* al 75% presentó inhibición significativa, esto significa que es probable que al repetirse este tipo de investigación se presenten halos de inhibición. Con las muestras de miel de *Tetragonisca angustula* y *Melipona beecheii* de 25 y 50 % y las diluciones de *Apis mellifera* no se presentó el número de halos de inhibición necesarios para que la prueba binomial resultara significativa y validar la inhibición de la bacteria.

LIMITACIONES O DIFICULTADES PRESENTADAS: No se presentó ninguna limitación.

Actividad No. 11: *INFORME FINAL*

OBJETIVOS: Elaborar el informe final como medio divulgativo de la investigación realizada.

PROCEDIMIENTO: Con los resultados obtenidos se elaboro la discusión de resultados, realizando consultas al Licenciado Federico Nave, Licenciada Carmen Yurrita, Licenciada Antonieta Rodas, Licenciada Eunice Enríquez, además de comparar los resultados obtenidos con la publicación de Demera, J., III Seminario Mesoamericano sobre Abejas sin Aguijón, Tapachula, Chiapas, México.

RESULTADOS: Se elaboró el informe final de la investigación, en el cual como conclusión principal se demuestra que la miel de *Tetragonisca angustula* y *Melipona beecheii* a una dilución del 75 % sí presenta efectividad antibacteriana.

LIMITACIONES O DIFICULTADES PRESENTADAS: Poca bibliografía para la elaboración de la discusión de resultados.

ANEXOS

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA
PROGRAMA DE EXPERIENCIAS DOCENTES CON LA COMUNIDAD
PROGRAMA DE EDC-BIOLOGÍA

INFORME FINAL DE EDC
“DETERMINACIÓN DE LA EFECTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LA MIEL DE *APIS MELLIFERA*,
MELIPONA BEECHEII Y *TETRAGONISCA ANGUSTULA* SOBRE CEPAS DE *STAPHYLOCOCCUS*
AUREUS ATCC 25923 IN VITRO”

Br. María José Dardón Peralta

Supervisora EDC Licda. María Eunice Enríquez

Asesora de Investigación Licda. Carmen Yurrita

INDICE

RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN	4
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	5
OBJETIVOS	5
JUSTIFICACIÓN	5
REFERENTE HISTÓRICO	5
METODOLOGÍA	9
DISEÑO	9
INSTRUMENTOS PARA REGISTRO Y MEDICIÓN	10
TÉCNICAS PARA LA RECOLECCIÓN DE DATOS	11
RESULTADOS	12
ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS	13
CONCLUSIONES	15
RECOMENDACIONES	15
REFERENCIAS	16
ANEXOS	18

RESUMEN

Las abejas son uno de los grupos de insectos más importantes debido a su capacidad de producción de miel, cera y propóleo, por lo que el hombre las maneja desde tiempos remotos para la obtención de estos productos. Uno de los productos más importantes es la miel, la cual ha sido utilizada generalmente como un edulcorante por sus excelentes propiedades desde épocas remotas de la humanidad, donde se conocían de manera empírica sus propiedades nutritivas y medicinales, y con ambos fines se ha utilizado. En la actualidad la especie más utilizada para la producción de miel es *Apis mellifera* debido a la alta capacidad de producción comparada con especies de abejas nativas de América, como *Melipona beecheii* y *Tetragonisca angustula*. Tanto la miel de *Apis mellifera* como la de los meliponinos han sido estudiadas por sus propiedades antibacterianas, las investigaciones reportan que las mieles llegan a variar en su composición y propiedad antibacteriana según el área geográfica de donde provengan y la especie de abeja que la produce (Demera, 2003). Ante esto es necesario conocer si la miel producida por las abejas presentes en nuestro país también presentan actividad antibacteriana.

El propósito de esta investigación fue determinar la efectividad antibacteriana de la miel producida por *Apis mellifera*, *Melipona beecheii* y *Tetragonisca angustula* sobre cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 in vitro, además de determinar en que porcentaje de dilución la muestras de miel de las especies utilizadas, presentaban efectividad antibacteriana. Para esto se utilizaron muestras de miel, que fueron diluidas en 3 concentraciones distintas, 25, 50 y 75% , diluciones que fueron aplicadas en discos de papel y colocados en una caja de Petri que contenía a *S. aureus*, se incubaron y después de 24 horas se determinó efectividad antibacteriana por la presencia o ausencia de un halo de inhibición.

Se encontró que tanto *Tetragonisca angustula* como *Melipona beecheii* presentaron efectividad antibacteriana a una dilución de 75 % contra *Staphylococcus aureus*, esto coincide con diversas investigaciones realizadas, sin embargo es necesario realizar más investigaciones en los que se controlen factores como el origen de las muestras de miel y fuentes de recursos florales de los que se alimentan las abejas, lo que permitiría realizar comparaciones entre distintas muestras de miel.

DETERMINACIÓN DE LA EFECTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LA MIEL DILUIDA DE *APIS MELLIFERA*, *MELIPONA BEECHEII* Y *TETRAGONISCA ANGUSTULA* SOBRE CEPAS DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* ATCC 25923 IN VITRO.

INTRODUCCIÓN

En el orden Hymenoptera, superfamilia Apoidea se encuentran las abejas, que comprenden alrededor de 20,000 especies en el mundo. Las abejas son de gran importancia debido a que actúan como importantes polinizadores de plantas, además suelen generar productos utilizados por el humano con fines nutritivos y medicinales. Se clasifican en 11 familias, entre estas se encuentra la familia Apidae. (Ayala, 1998, Marroquín, 2000)

Por lo general las abejas tienen un rango de tamaño se 2 a 39 mm de largo con una biomasa de menos de 1 mg a más de 1 g. Se caracterizan por tener el cuerpo bastante peludo, los pelos del cuerpo suelen ser ramificados o plumosos. (Marroquín, 2000)

De las 20,000 especies estimadas, sólo una minoría vive en colonias permanentes, altamente sociales y de manera compleja. En la familia de los Apidae, las abejas sin aguijón (Meliponinae) y las abejas de miel (Apinae) son las únicas subfamilias que presentan una organización en grandes colonias y que acumulan grandes cantidades de alimento. Las seis especies de Apinae, se encuentran en el género *Apis*, las cuales son abejas generalistas por lo que se encuentran en diversidad de ambientes. Las abejas sin aguijón se encuentran divididas en dos tribus que son Meliponini y Trigonini, y se encuentran restringidas a regiones del trópico.

Existen aproximadamente alrededor de 400 especies de Meliponinos que difieren en el tamaño de su cuerpo, comportamiento, estructura del nido y la elección de alimento. Por lo que no sorprende la gran variación en la calidad de miel producida por abejas de este grupo, en especial las de la tribu Trigonini, que utilizan además del néctar de las flores, frutas, azúcar, heces de mamíferos, ureas, hongos y líquidos de animales muertos. La composición de estas mieles difieren enormemente de la producida por *Apis mellifera*. (Bruijn, sf).

Tetragonisca angustula es uno de los meliponinos más comunes que se encuentran en América, aparentemente sigue la distribución del Bosque Tropical Perennifoleo. *Melipona beecheii* es una de las especies más utilizadas en Guatemala y México para la producción de miel (Meliponicultura). (Ayala, 1999)

Muchos son los productos que nos ofrecen las abejas, entre ellos se encuentra el polen, la jalea real, la cera, el veneno de abeja, el propóleo y la miel. Desde la antigüedad, la miel forma parte de las fórmulas de ungüentos, bálsamos y perfumes. La miel posee propiedades nutritivas, biológicas y terapéuticas, siendo estas últimas las más importantes en la elaboración de diversos trabajos de investigación debido a sus cualidades como su acidez, osmolaridad, presencia de peróxido de hidrógeno. Estas investigaciones, en su mayoría, se realizan para validar el uso de los productos de las colmenas de abejas a nivel terapéutico.

A pesar de haber sido identificados estos componentes como los principales factores que le confieren propiedades medicinales a la miel, la mayoría de estudios han sido enfocados a la miel producida por *Apis mellifera* y se ha obviado la investigación de las mieles de abejas nativas (meliponinos). El propósito de esta investigación era determinar la efectividad antibacteriana de la miel producida por *Apis mellifera*, *Tetragonisca angustula* y *Melipona beecheii*. Se comprobó la efectividad antibacteriana de *Melipona beecheii* y *Tetragonisca angustula* sobre *Staphylococcus aureus* a una dilución del 75 %, por lo que son mieles con amplias posibilidades en el mercado naturista como producto antibacteriano en afecciones de la piel.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A nivel mundial los productos naturales han tomado nuevamente un papel muy importante en la medicina, los productos de las colmenas de las abejas son unos de ellos. El propóleo, la miel y la jalea real destacan enormemente. En Guatemala se utilizan estos productos de manera tradicional como tratamientos medicinales en distintas afecciones, tales como cataratas, asma, tos, gastritis, cicatrizante, entre otros, sin embargo estos conocimientos no han sido validados científicamente. Las mieles más utilizadas en el país son las producidas por *Apis mellifera*, *Melipona beecheii* y *Tetragonisca angustula*. Sin embargo en Guatemala no se han realizado estudios que validen o rechacen la actividad antibacteriana de la miel producida por meliponinos ni se conoce aun las características fisicoquímicas de estas mieles. Para la realización de esta investigación se utilizó a *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 debido a su insensibilidad a la osmolaridad y al pH (Grajales-Conesa, 2003). Esta bacteria suele ser la causante de las infecciones más comunes como infecciones post-operatorias, pústulas, etc. por lo que su utilización en esta investigación permitirá conocer el efecto antibacteriano de la miel en afecciones de la piel.

OBJETIVOS

General

- Determinar la efectividad antibacteriana de la miel de *Apis mellifera*, *Melipona beecheii* y *Tetragonisca angustula* sobre cepas de *Staphylococcus aureus* in vitro.

Específicos

- Determinar las diluciones de las mieles que presenta mayor efectividad antibacteriana in vitro.
- Realizar un primer intento en la implementación de la técnica de saturación de discos para la determinación de actividad antibacteriana de la miel de abejas.

JUSTIFICACIÓN

La miel ha sido utilizada generalmente como un edulcorante por sus excelentes propiedades desde épocas remotas de la humanidad, donde se conocían de manera empírica sus propiedades nutritivas y medicinales. La especie más utilizada para la producción de miel ha sido *Apis mellifera* por su alta capacidad de producción comparada con especies como *Tetragonisca angustula*. Sin embargo en otros países (Vit, 1994) se ha demostrado que la miel de esta última especie si presenta efectividad en el tratamiento de diversas enfermedades. En Guatemala no se ha realizado ninguna investigación sobre la actividad antibacteriana de las mieles de meliponinos. Demostrar la efectividad antibacteriana de la miel de meliponinos contribuiría a la validación del conocimiento popular en nuestro país y presentaría una nueva opción de medicina natural para el tratamiento de afecciones de la piel causada por *Staphylococcus aureus*.

REFERENTE TEÓRICO

HISTORIA

Existen claros indicios del empleo de la miel como alimento desde la época prehistórica, en el antiguo Egipto, hace 6000 años, se conocía que objetos envueltos en miel pura no se estropean y por ello la utilizaban para embalsamar a sus muertos (López, 1997). En un experimento realizado en 1971 se demostró que trozos de pescado, riñón, hígado y otros tejidos de origen animal, cubiertos con miel conservaron su frescura a temperatura ambiente durante 4 años, mientras que los trozos cubiertos con miel artificial (mezcla de azúcares como glucosa y levulosa, y solución fisiológica) comenzaron a descomponerse al quinto u octavo día. (Asis, 1997)

Cuando los antiguos egipcios hacían sus expediciones, conservaban la carne en barriles llenos de miel. En la tumba del faraón Tutankamón fueron encontradas, en 1922, en perfectas condiciones, varias vasijas con miel, a pesar de los 33 siglos transcurridos. (Asis, 1997) En Grecia, en el siglo V a.C., el médico Hipócrates la recomendaba a sus pacientes como alimento para aumentar la longevidad. Por su parte, los romanos de la época imperial pensaban que la miel debía formar parte de la dieta diaria para mantener una buena salud y vivir muchos años.(López, 1997). La llamada *luna de miel* tiene su origen en la costumbre romana de que la madre de la novia desposada dejaba cada noche en la alcoba nupcial, a disposición de los recién casados, una vasija con miel para “reponer energías”. Esta práctica duraba toda la luna. (Asis, 1997)

La civilización islámica no fue indiferente a las bondades de la miel, uno de los libros del Corán está dedicado a la abeja: en él se explica cómo Dios enseña al insecto a elaborar miel. “La miel es un remedio para todas las enfermedades”, dejó dicho el profeta Mahoma (López, 1997). Cuando Alejandro Magno murió en Babilonia, fue traslado hasta Macedonia en un recipiente lleno de miel y el cadáver se conservó intacto hasta su llegada (Asis, 1997).

En los últimos años se han generado diversas investigaciones en las que se pone de manifiesto las diversas propiedades de la miel (y otros productos de la colmena) en el tratamiento de enfermedades gastrointestinales, oftalmológicas, dermatológicas, etc.

Antes de la conquista española los Mayas criaban abejas nativas sin aguijón, la cual jugó un importante papel en su cultura, ya que la miel era utilizada con fines rituales en sus ceremonias religiosas, como producto medicinal y como alimento. Sin embargo esta práctica se ha perdido con la introducción de la abeja europea (Villanueva, 2003).

GENERALIDADES DE LAS ABEJAS

Dentro del orden Hymenoptera, superfamilia Apoidea se encuentran las abejas, que comprenden alrededor de 20,000 especies en el mundo, de gran importancia debido a que juegan un papel importante en la ecología como polinizadores de plantas, al coleccionar polen y néctar o aceites de angiospermas que utilizan para proveer alimento a sus larvas. Las abejas se clasifican en 11 familias, entre ellas se encuentra la familia Apidae (Ayala, 1998, Marroquín, 2000).

Las abejas tienen un rango de tamaño de 2 a 39 mm de largo, sin embargo hay algunas con mayor tamaño. La mayoría presenta una biomasa de menos de 1 mg a más de 1 g. Se caracterizan por tener el cuerpo bastante peludo, los pelos del cuerpo suelen ser ramificados o plumosos.

De las 20,000 especies estimadas, solo una minoría vive en colonias perennes, altamente sociales y de manera compleja. En la familia Apidae, las abejas sin aguijón (Meliponinae) y las abejas de miel (Apinae) son las únicas subfamilias que presentan colonias que acumulan grandes cantidades de alimento. Las seis especies de Apinae, se encuentran en el género *Apis*, y se encuentran de forma nativa en las regiones frías con condiciones de temperatura bajas y han colonizado regiones con condiciones similares. Las abejas sin aguijón se encuentran divididas dentro de dos tribus que son Meliponini y Trigonini, existe mayor diversidad en comparación con *Apis*, siendo los meliponinos exclusivos de las regiones tropicales (Ayala, 1999).

Existen aproximadamente 400 especies de Meliponinos que difieren en el tamaño de su cuerpo, comportamiento, estructura del nido y la elección de alimento. Por lo que no sorprende la gran variación en la calidad de miel producida por abejas de este grupo, en especial las de la tribu Trigonini, que utilizan además del néctar de las flores, frutas, azúcar, heces de mamíferos, ureas, hongos y líquidos de animales muertos. La composición de estas mieles difieren enormemente de la producida por *Apis mellifera*. (Bruijn, sf).

Tetragonisca angustula es uno de los meliponinos más comunes que se encuentra en América, en México aparentemente sigue la distribución del Bosque Tropical Perennifole. En Centro América. es muy común. Tiene el cuerpo pequeño, delgado y muy esbelto su integumento es amarillo y negro. *Melipona beecheii* presenta una longitud del cuerpo entre 9.7-10.7 mm, integumento en su mayoría negro, con dibujos amarillos, pardos y negros en las patas, es también una de las especies utilizadas en la Meliponicultura desde épocas precolombinas (Ayala, 1999).

Muchos son los productos que nos ofrecen las abejas, entre ellos se encuentra el polen, la jalea real, la cera, el veneno de abeja, el propóleo y la miel. Desde la antigüedad, la miel forma parte de las fórmula de ungüentos, bálsamos y perfumes (Brujin, sf.).

LA MIEL

La miel se define como un fluido dulce, denso, transparente y viscoso; resultante de la acción enzimática sobre el néctar de las flores y exudados de las partes vivas de las plantas. Es el carbohidrato que necesitan las abejas en todas las etapas de su vida como fuente de energía. Es la sustancia dulce que las abejas producen tras un complicado proceso de elaboración, en el que toman el néctar de las flores y los jugos azucarados de otras partes de la planta, así como las secreciones dulces de los pulgones. Las abejas pecoreadoras absorben con su probóscide el néctar, lo depositan en su buche; y vuelven a la colmena para entregarlo a las obreras jóvenes, quienes a su vez lo pasan a su buche y lo regurgitan repetidas veces. De este modo el néctar es enriquecido con fermentos, ácidos y albúmina.(López, 1997)

La composición bioquímica de la miel es la siguiente:

- Monosacáridos; constituyen el 60 a 80 % de la miel, sus principales componentes son la glucosa y la fructosa, además de pequeños restos de maltosa, melibiosa, etc., lo que hace que su absorción sea muy rápida y se evitan procesos de fermentación en el mismo.
- Agua; El agua constituye entre un 15 y 20 % de la miel y es la principal responsable de su consistencia, la miel de mejor calidad es la que posee menor cantidad de agua.
- Minerales; Se encuentran en las siguientes combinaciones KO, PO, NaO, MgO, SiO₂, SO, SI, Fe y Cu, en una proporción global de un 0.15 a un 0.5 % en la miel. También existen otros oligoelementos. El potasio y el fósforo, que se encuentran en elevada proporción en la miel, tienen un papel muy importante en el metabolismo de los hidratos de carbono.
- Sustancias Nitrogenadas; Se han encontrado en la miel hasta 17 aminoácidos diferentes en una proporción de 0.4 a un 1.4 %. Además de algunas aminas biógenas se han encontrado otras sustancias nitrogenadas aún desconocidas. Actualmente se realizan estudios sobre el papel de los péptidos en las propiedades medicinales de la miel.
- Ácidos orgánicos; Ácido fórmico, cítrico, láctico, acético, succínico, málico y tartárico se hallan presentes en la miel en la proporción de un 0.3 a un 0.9 % y son los responsables de la acidez de la misma, con un pH entre 3.6 y 4.2.
- Enzimas; Se presentan enzimas como las siastasas, invertasas, maltasas, hidrogenasas, etc. Desde el punto de vista medicinal, los fermentos más importantes son las distasas y las invertasas, las cuales favorecen la digestión de los alimentos.
- Vitaminas y hormonas; La miel contiene ácido ascórbico y otras sustancias como la vitamina C, A y B, aunque su presencia es tan escasa que llega a considerarse de poca importancia.
- Inhibinas; Se ha demostrado que estas poseen una acción antibiótica, impidiendo el crecimiento y desarrollo de las bacterias. Se ha identificado que estas sustancias son principalmente peróxido de hidrógeno. (López, 1997)

Contenido de agua y pH en *Apis mellifera* y meliponinos:

	<i>A. mellifera</i>	Meliponinos
Agua	16-22 %	18-30 %
PH	3.9*	3.7*

*Valores promedio de pH. (López, 1997)

PROPIEDADES DE LA MIEL

La miel posee propiedades nutritivas, biológicas y terapéuticas, siendo estas últimas base para la elaboración de diversos trabajos de investigación en la actualidad. La miel ha sido utilizada extensamente en medicina por su poder germicida y anticriptogámico, su empleo se ha dado entre babilonios, egipcios, hebreos, asirios, chinos, griegos, mayas y otros pueblos, donde su uso era habitual. Su valor es inestimable en la curación de heridas y quemaduras, en aplicación tópica. Se usa en cirugía de carcinoma en la vulva, el tratamiento posterior evita las terribles infecciones en esa área y actúa como un excelente germicida. (López, 1997)

Se ha utilizado para tratar a personas enfermas que padecen de astenias o estados de cansancio en todos los grados, agotamiento físico, envejecimiento, carditis, faringitis, laringitis, sinusitis, afecciones bronquiales en general, insomnio, llagas infectadas, ulceraciones, gastritis, quemaduras, parásitos intestinales, afecciones dermatológicas y estomatológicas. (López, 1997)

ACCION ANTIBACTERIANA

La actividad antibacteriana de la miel está relacionada con 3 factores:

- Acidez de la miel: El poder bactericida de la miel está condicionada por la parte ácida de ésta. Las soluciones de un alcali (NaOH) a 1-2% neutralizan las sustancias antibacterianas de la miel.
- Osmolaridad: El alto contenido de azúcares hace que ninguna bacteria u hongo pueda desarrollarse.
- Peróxido de hidrógeno: Producido por la enzima glucosaoxidasa, la cual puede ser inactivadas por el calor y la luz.

Parte de las propiedades de la miel se pierden con el calor por lo que la miel no debe de pasteurizarse a mas de 69 C.

En uso externo, la miel es un buen cicatrizante. Las inhibinas, los monosacáridos y el factor colinérgico, son los responsables de la acción curativa de la miel sobre las heridas. Los monosacáridos y las inhibinas impiden el desarrollo bacteriano, mientras que la acetilcolina favorecería el riego sanguíneo y los procesos curativos de los tejidos dañados.

El tracto digestivo es el tubo muscular que se extiende desde la boca a través del estómago y los intestinos, hasta el ano, su función es descomponer los alimentos para la absorción de nutrientes esto lo realiza a través de enzimas que se encuentran en el jugo gástrico. Además el jugo gástrico impide el desarrollo y el paso de bacterias nocivas por el tubo digestivo, cuando éste falta o es segregado en cantidades insuficientes aparece entonces el peligro de que aparte de no digerir suficientemente los alimentos, se desarrollen bacterias nocivas en el tubo digestivo, como *Staphylococcus aureus*. La miel favorece en estos casos ya que produce un aumento en la secreción de jugo gástrico y, mediante la acción de las inhibinas impide el desarrollo bacteriano. (López, 1997)

STAPHYLOCOCCUS AUREUS:

El género *Staphylococcus* pertenece a la familia Micrococcaceae, el nombre se deriva del griego *Staphyle* que significa racimo de uvas y *Kokkos* que significa grano. Su diámetro varía entre 0.5-1.5 μm ., son cocos gram positivo, no móviles y no esporoformadores. Pocas cepas producen una cápsula o cepa mucosa que incrementa la virulencia del organismo y la mayoría son anaerobios facultativos. Existen tres especies: *S. aureus*, *S. epidermidis* y *S. saprophyticus*. (Vega, 1991)

S. aureus tiene un crecimiento óptimo a una temperatura de 30-37 °C, pH óptimo de 7.0 a 7.5. A pesar de sus complejos requerimientos nutricionales, los estafilococos crecen bien en muchos medios de rutina, la producción de pigmento se puede observar mejor en placas de agar a 37 °C . *S. aureus* es un componente de la microbiota normal de la piel y mucosa nasal, su transmisión desde estos sitios provoca infecciones. El contacto directo a través de las manos es la vía de transmisión más importante. El rasgo característico de una infección estafilocócica es la formación de abscesos en cualquier parte del cuerpo, la lesión básica consiste en inflamación, infiltrado leucocitario y necrosis. Las infecciones más comunes incluyen celulitis, pústulas, carbúnculos, impétigo, infecciones post-operatorias, neumonías y gran variedad de infecciones nosocomiales. (Vega, 1991)

Es muy importante el problema terapéutico causado por los estafilococos resistentes a los medicamentos. *S. aureus* ha demostrado versatilidad en su habilidad para desarrollar resistencia a antibióticos clínicamente efectivos, es un agente causal de más del 10% de infecciones nosocomiales, 20% de intoxicación alimenticia y 10% de infecciones quirúrgicas. (Vega, 1991)

METODOLOGÍA

DISEÑO

POBLACIÓN:

Abejas de *Apis mellifera*, *Melipona beecheii* y *Tetragonisca angustula*

Bacterias de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

MUESTRA:

Miel:

Apis mellifera: las muestras de miel utilizadas fueron obtenidas de miel de venta comercial, producida en la costa sur de Guatemala.

Tetragonisca angustula: :Extracciones de miel del Meliponario ubicado en el Museo de Historia Natural en el mes de junio del 2003.

Melipona beecheii: Las muestras de miel utilizadas se obtuvieron de muestras de miel colectadas en el año 2000 en Pueblo Nuevo Viñas, Santa Rosa.

Bacteria:

Cepa de bacteria de *Staphylococcus aureus* proporcionada por la sección de Microbiología del Laboratorio Clínico Popular de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

TRAMIENTOS:

Miel de...	Grado de dilución	No. De réplicas
<i>T. angustula</i>	25 %	5
<i>T. angustula</i>	50 %	5
<i>T. angustula</i>	75 %	5
<i>M. beecheii</i>	25%	5
<i>M. beecheii</i>	50 %	5
<i>M. beecheii</i>	75%	5
<i>A. mellifera</i>	25 %	5
<i>A. mellifera</i>	50 %	5
<i>A. mellifera</i>	75 %	5
Control:		
Agua destilada		5

Total de cajas: 50

INSTRUMENTOS PARA REGISTRO Y MEDICIÓN DE LAS OBSERVACIONES

MEDIOS DE CULTIVO:

- Agar Mueller Hinton

EQUIPO Y CRISTALERÍA:

- Tubos de ensayo
- Cajas de Petri descartables
- Hisopos de algodón
- Mechero Bunsen
- Incubadora
- Autoclave eléctrica
- Regla milimetrada
- Asa bacteriológica
- Goteros
- Guates y mascarilla
- Discos de papel secante de 6mm de diámetro
- Frascos de vidrio oscuro
- Pipeta volumétrica calibrada
- Pinzas
- Espectrofotómetro
- Micropipetas
- Baño de agua
- Beakers
- Probetas graduadas

INSTALACIONES:

- Laboratorio de Entomología Aplicada y Parasitología (LENAP). Escuela de Biología. USAC.
- Laboratorio de Físicoquímica. Escuela de Química. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia

TÉCNICAS UTILIZADAS EN EL PROCESO DE INVESTIGACIÓN

RECOLECCION DE DATOS

FASE EXPERIMENTAL:

Colecta de las muestras de miel:

La miel de *Apis mellifera* fue comprada, siendo su origen de la Costa Sur de Guatemala. La miel de *Tetragonisca angustula* se obtuvo por medio de extracciones utilizando una jeringa y la miel fue succionada de los potes de miel, de una colmena en caja, ubicada en el Meliponario del Jardín Botánico, durante el mes de junio del 2003, la miel fue depositada en frascos color ámbar para evitar la alteración de la miel por exposición lumínica. La miel de *Melipona beecheii* utilizada se encontraba en el Laboratorio de una colecta realizada en el año 2000 en Pueblo Nuevo Viñas.

Preparación de la muestra de miel:

Las muestras se mantuvieron en frascos de vidrios en condiciones de oscuridad, a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron las diluciones utilizando agua destilada y una micropipeta se prepararon diluciones al 25%, 50% y 75 % de las tres muestras de mieles. Para diluir la muestra de miel de *Apis mellifera* fue necesario calentarla en baño maría, debido a que esta miel presentó mayor viscosidad y no era posible tomarla con la micropipeta al tomar la cantidad de miel necesaria para diluir con agua destilada. Se controló la temperatura, la cual se mantuvo alrededor de los 40 grados centígrados, con el fin de evitar que los componentes presentes en la miel fuesen alterados.

Determinación de la humedad de las mieles utilizadas:

Se realizó la medición del porcentaje de humedad de las mieles utilizadas para la determinación de la efectividad antibacteriana de las mieles sobre *Staphylococcus aureus*, por medio de un refractómetro y conocer por lo menos una propiedad fisico-química de las mieles colectadas.

Preparación de medios de cultivo:

Se preparó el agar Mueller- Hinton según especificaciones del fabricante, se dejó enfriar y se prepararon los medios en cajas de Petri desechables donde se dejó reposar hasta solidificar. Se mantuvieron en refrigeración hasta ser utilizadas.

Cultivo de bacterias:

Se preparó una solución de bacterias empleando una asa bacteriológica, tomado un grupo de bacterias *S. aureus* y sumergiéndolas en una solución salina dentro de un tubo de ensayo. Esta solución se compara con un estándar de Macfarland 0.5, para conocer la concentración de la solución preparada. Si las soluciones no eran iguales respecto a la densidad se agregaba más colonias de bacterias hasta equipararlas.

Utilizando un hisopo estéril se sumergía el mismo en la suspensión estandarizada del inóculo y se estriaba sobre la superficie de agar en tres direcciones, hasta cubrir la totalidad de la superficie de la caja de Petri.

Preparación de los tratamientos:

Se saturaron los discos de papel filtro estériles con las diferentes diluciones de miel de las tres distintas muestra de miel de abejas, utilizando una micropipeta y aplicando la miel directamente en el disco hasta saturarlos. Luego los discos fueron colocados utilizando una pinza estéril, las cajas luego fueron incubadas a 35 °C durante 24 horas.

Determinación de la actividad inhibitoria in vitro:

Después de 24 horas se determinó la presencia de un halo de inhibición para determinar ausencia o presencia de efectividad antibacteriana de la miel, se tomaron las medidas de los diámetros de la zona de inhibición utilizando una regla milimetrada y se anotaron los datos para su análisis.

ANÁLISIS DE DATOS

Se realizó un análisis descriptivo, debido al tipo de datos obtenidos, por lo que se realizó una clasificación de las respuestas como positivo (si inhibición) y negativo (no inhibición), descartando las que no tuvieron efecto. Las mieles que presentaron una respuesta positiva se les aplicó una prueba binomial.

RESULTADOS

Determinación porcentaje de humedad de las mieles

Especie	Grados brix	Porcentaje de humedad
<i>Melipona beecheii normal</i>	73.6	22.6
<i>Melipona beecheii 25 %</i>	25.1	> 25
<i>Melipona beecheii 50 %</i>	42.0	> 25
<i>Melipona beecheii 75 %</i>	56.0	> 25
<i>Tetragonisca angustula pura</i>	80.5	18.2
<i>Tetragonisca angustula 25 %</i>	No se realizo	
<i>Tetragonisca angustula 50 %</i>	39	> 25
<i>Tetragonisca angustula 75 %</i>	63.25	> 25
<i>Apis mellifera pura</i>	78.3	20
<i>Apis mellifera 25 %</i>	23.0	> 25
<i>Apis mellifera 50 %</i>	47.0	> 25
<i>Apis mellifera 75 %</i>	60.4	> 25

Efectividad antibacteriana

Apis mellifera

% Dilución	n= # de muestras	Positivas	Negativas	Probabilidad
25	21	0	21	No significativo
50	21	0	21	No significativo
75	21	0	21	No significativo

Tetragonisca angustula

% Dilución	n= # de muestras	Positivas	Negativas	Probabilidad
25	21	1	20	No significativo
50	21	4	17	No significativo
75	21	15	6	Significativo

Melipona beecheii

% Dilución	n= # de muestras	Positivas	Negativas	Probabilidad
25	21	1	20	No significativo
50	19	10	9	No significativo
75	21	18	3	Significativo

PROBABILIDAD BINOMIAL

n=19
p=0.5
alfa=0.05
mínimo de éxitos= 13 mínimo de fracasos= 4

n= 21
p=0.5
alfa=0.05
mínimo de éxitos= 14 mínimo de fracasos= 6

ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

La miel de *Tetragonisca angustula* presenta menor porcentaje de humedad, aproximadamente 18 %, le sigue *Apis mellifera* con 20 % de humedad y el mayor porcentaje de humedad lo presenta la miel de *Melipona beecheii* con 22.6 %. Es evidente que existe una gran variación en las mieles de los meliponinos y la de *Apis mellifera* presentes en Guatemala, tendencia que se observa en estudios realizados en otros países como México, donde se reporta que la miel de los meliponinos contiene mayor humedad que la miel de *Apis mellifera*, sin embargo en este trabajo, no se observó esta tendencia, ya que la miel de *Tetragonisca angustula* presentó menor porcentaje de humedad que *Apis mellifera*, cuando en otros estudios, se da de forma contraria y se reporta que la miel de *Apis mellifera* presenta menor porcentaje de humedad que la miel de *Tetragonisca angustula*. (Demera, J, 2003) Estos resultados nos indican que las propiedades fisicoquímicas de las mieles nativas de Guatemala pueden presentar diferencias con las de otros países lo cual debe ser investigado para ser confirmado.

Es necesario mencionar que la muestra de miel de *Tetragonisca angustula* utilizada en esta investigación fue obtenida en el Meliponario ubicado en el Museo del Jardín Botánico, en el cual se realizan actividades de alimentación artificial utilizando miel de *Apis mellifera*, debido a esto es probable que la muestra de miel de *Tetragonisca angustula* utilizada pudo diferir en porcentaje de humedad y propiedades antibacterianas comparada con una colmena de estas abejas que se alimenta de forma natural colectando su propio alimento. Debido a esto puede asumirse que las abejas de *Tetragonisca angustula* toman la miel de *Apis mellifera* colocada en sus cajas, por lo que es posible que la miel utilizada sea un producto de ambas abejas, donde las abejas *Apis mellifera* fueron el productor inicial y las de *Tetragonisca angustula* aportaron para su cualidad pero en menor grado. Esta situación debe ser considerada en la realización de futuras investigaciones.

La diferencia de humedad en las muestras de miel puede ser producto de una diferencia en las mieles provenientes de distintas áreas geográficas, esto influye debido a que en cada lugar existe distintos recursos florales por lo que las abejas utilizan distintas flores o resinas para la producción de miel por lo que también cambian las cualidades físico-químicas de la miel y probablemente a sus propiedades antibacterianas si es que la presentan. Otro factor que puede marcar la diferencia de humedad presente en las muestras de miel analizadas puede ser el origen entomológico (cada especie de abeja) y que según el tipo de abeja así cambie las cualidades de la miel. Esto indica la importancia de realizar estudios para conocer las cualidades de la miel de nuestro país y además realizar una comparación entre distintas áreas geográficas que presenten variación en recursos florales de los que las abejas obtengan polen, néctar y resinas, para la elaboración de la miel.

En las pruebas de efectividad antibacteriana los resultados obtenidos indican que la miel de *Apis mellifera* no presentó actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* en ninguna de las tres distintas diluciones que fueron preparadas, por lo que la miel producida en la Costa Sur y de venta comercial no posee propiedades antibacterianas contra afecciones con *Staphylococcus aureus*. Sin embargo estudios realizados en Cuba (Asís, 1996) utilizando miel de *Apis mellifera* la recomiendan para el uso de afecciones de la piel, por lo que debe realizarse mayor investigación con mieles de esta abeja en nuestro país para concluir si presenta o no efectividad antibacteriana.

La miel de *Tetragonisca angustula* si presentó actividad antibacteriana a una dilución de 75 % y una inactividad a 25 y 50 %. Sin embargo estos resultados entran en contradicción con el supuesto que la humedad de las mieles varíe debido a que *Tetragonisca angustula* únicamente tome la miel proporcionada artificialmente de *Apis mellifera* y la coloque en sus potes, sin llegar a producir su propia miel, caso propuesto para la miel proveniente del Meliponario, y que debido a esto presente un porcentaje de humedad inverso a lo que ha sido reportado en otras investigaciones, ya que si presento efectividad antibacteriana, lo que refuerza la idea de que a pesar de tomar la miel proporcionada ellas la manipulan, cabe recordad que las abejas al transportar la miel, lo hacen pasándosela de una a otra dentro de sus buches y es aquí donde se les incorporan enzimas que son consideradas como una de las causantes de la actividad antibacteriana. Se debe mencionar que la miel con la que se alimentó a *Tetragonisca angustula* no es la misma que se utilizó en la determinación de la efectividad antibacteriana de *Apis mellifera* por lo que debe considerarse que la miel de esta especie llegue a variar según su origen, debido a que exista una diferencia en las cualidades de las mieles debido a factores como por ejemplo su origen floral aunque sean abejas de la misma especie.

La miel de *Melipona beecheii* presentó actividad antibacteriana en la dilución de 75 %, mientras que las diluciones de 25 y 50 % fueron inefectivas contra *Staphylococcus aureus*. Esto nos puede indicar que a mayor concentración de miel (miel pura) mayor efectividad antibacteriana, sin embargo es difícil sugerir que la dilución de la miel sea un factor que influya en la actividad antibacteriana de la miel puesto que la cantidad de miel aplicada en los discos de papel fue muy pequeña, y que a esto se deba el que no se haya observado efectividad antibacteriana en concentraciones pequeñas de miel, y que en la dilución de 75 % de la miel se encontraran en mayor grado las características fisicoquímicas de la miel que le confieren propiedades antibacterianas.

El hecho de que la miel de *Melipona beecheii* utilizada para la realización de esta prueba, fue cosechada en el año 2000, pudo afectar en los resultados debido a que probablemente sus propiedades disminuyeran con el paso del tiempo. A pesar de haberse observado efectividad antibacteriana, esta puede ser mayor si la miel fuera de una cosecha reciente. Es posible que con el tiempo y la manipulación de la miel disminuyan sus propiedades por descomposición de componentes principales. Además es importante mencionar que esta miel fue obtenida en una región con recursos florales mucho más variados de los que se encuentran en la Costa Sur, de donde provenía la miel de *Apis mellifera*, lo que puede indicar que los recursos florales influyen en las propiedades antibacterianas de la miel.

Debe considerarse también que la osmolaridad de la miel no debe ser un factor que influya en la efectividad antibacteriana de la miel, pues tanto la miel de *Tetragonisca angustula* y *Melipona beecheii* inhibieron a una dilución de 75 % a pesar de presentar distintos porcentajes de humedad en las muestras de miel puras, además deben realizarse más estudios comparando el límite de humedad en el que se presenta efectividad antibacteriana, en este estudio la dilución de 75 % presento actividad antibacteriana y la de 50 % ya no, en ambas muestras de miel, de la dos abejas de meliponinos, sin embargo es difícil asegurar, que cantidad de agua permite el efecto antibacteriano de la miel ya que no fue posible determinar la humedad de las dos últimas diluciones por falta de bibliografía en la que se presenten los datos de humedad para los grados Brix tomados con el refractómetro.

La determinación de la efectividad antibacteriana de la miel de meliponinos en diluciones del 75 % nos puede indicar que a menor presencia de agua (menor humedad), se disminuye las probabilidades de vida de *Staphylococcus aureus* inhibiendo el crecimiento de microorganismos. Sin embargo se debe tener claro que la actividad antibacteriana de la miel no se debe únicamente por uno o dos factores, como la osmolaridad o el origen entomológico de las mieles, sino que probablemente sea la combinación de varios factores lo que le confieran propiedades antibacterianas a la miel. Por lo que se necesitan la realización de más estudios que comprueben o rechacen esta suposición.

La metodología utilizada en este primer intento para determinar la efectividad antibacteriana permitió obtener resultados preliminares de las propiedades de las tres mieles utilizadas, sin embargo la técnica de halos de inhibición utilizando discos de papel impregnados con miel no es aceptada en investigaciones realizadas en otros países como México y Estados Unidos por lo que es necesario implementar una nueva metodología en la cual se controle de mejor manera la cantidad de bacterias empleadas en los cultivos donde se determina las propiedades antibacterianas de la miel.

CONCLUSIONES

- Los porcentajes de humedad que se encuentran en la miel de meliponinos difieren entre sí y también son distintos a los encontrados en la miel de *Apis mellifera*.
- Es necesario la caracterización de las características fisicoquímicas de las mieles de meliponinos de nuestro país para determinar si existe o no existe diferencia en sus características y propiedades antibacterianas con la miel producida por *Apis mellifera*.
- La miel de *Apis mellifera* no presentó actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* en ninguna de las tres diluciones preparadas.
- La miel de *Tetragonisca angustula* presentó actividad antibacteriana en la dilución de 75 % contra *Staphylococcus aureus*.
- La miel de *Melipona beecheii* presentó actividad antibacteriana en la dilución de 75 % contra *Staphylococcus aureus*.
- La metodología empleada permitió obtener resultados preliminares de las propiedades antibacterianas de la miel de nuestro país, pero esta metodología puede ser empleada si se lograra controlar las cantidad de bacterias a utilizar en cada medio de cultivo.

RECOMENDACIONES

- La fecha de cosecha y el sitio de origen de la miel debe ser los mismos para realizar comparaciones de muestras de miel de distintas especies de abejas.
- Si se trabaja con diluciones se debe de calentar las muestras de miel en baño María, cuidando de no elevar la temperatura de la miel a más de 40 °C para facilitar la toma de la cantidad de miel necesaria para la dilución exacta.
- Al realizar estudios de la efectividad antibacteriana de la miel, se debe conocer el origen de las muestras de miel y datos como las fuentes florales de las que se alimentan las abejas, para incluir mayor información en la discusión de resultados.
- Se deben realizar investigaciones en los que se determine la efectividad antibacteriana de estas mieles en intervalos de 50 a 75 % de dilución para conocer el límite en el que aun se presenta actividad antibacteriana.
- Implementar una nueva metodología en la realización de pruebas de determinación de efectividad antibacteriana de la miel.

REFERENCIAS

1. A.I. y E.R. Root. El ABC y el XYZ de la Apicultura. 1914. Trad. Otto Hollender. A.I. ROOT COMPANY. EUA. 439p.
2. Asis, M. Apiterapia para todos: Cómo usar los 7 productos de la colmena para curar. 1996 Editorial Científico-Técnica. La Habana, Cuba. 194 p.
3. Ayala, R. Revisión de las abejas sin aguijón de México (Hymenoptera; Apidae: Meliponini) 1999. Folia Entomológica. México. 106:1-123.
4. Bruijij, LLM & M. J. Somzmeÿer. The composition and properties of honeys of stingless bees (melipona). Sin fecha.
5. Cadena, M. Orientación Apícola. 1955 Ministerio Agricultura. Colombia. 53p.
6. Cartopass-Laurino M., DS Gelli. Analyse pollinique, propriétés physico-chimiques et actino antibactériene des miels d'abeilles africanisées. 1990.
7. Demera, J. & Angert, E. 2003. Comparison of the Antimicrobial Activity of Honey Produced by *Tetragonisca angustula* (Meliponinae) and *Apis mellifera* L. from Different Phytogeographic Regions of Costa Rica. III Seminario Mesoamericano sobre Abejas sin Aguijón. Tapachula, Chiapas, México.
8. Grajales-Conesa, J. et al. 2003. Propiedades física, químicas y antibacterianas de mieles de *Scaptotrigona mexicana* de la región Soconusco, Chiapas, México. III Seminario Mesoamericano sobre Abejas sin Aguijón. Tapachula, Chiapas, México.
9. León Ramírez, M. C. Evaluación de la calidad de la miel de abejas sin marca comercial, que se expende en la Ciudad de Guatemala. Guatemala: Universidad de San Carlos, (Tesis de Graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1982. 42 p.
10. Liska, P. Conferencia sobre propóleo. 1er. Congreso Nacional de Biología Guatemala 1984. Editado por Juan C. Godoy. Ciudad de Guatemala, Guatemala, EB-USAC, AGHN, CQFG, DB-UDV. 1985. pp.188-191.
11. López, G. Cómo cura la miel. 1997 Equipo revista Integral. Manuales Integral 7. Barcelona. 96p.
12. Marroquín Juárez, A. Sistemática e historia natural de las abejas (Hymenoptera: Apoidea) de Guatemala. Guatemala: Universidad de San Carlos, (Tesis de Graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 2000. 122p.
13. McGregor, S.E. La apicultura en estados unidos. 1971 Primera Edición. Centro Regional de Ayuda Técnica, Agencia para el Desarrollo Internacional, Departamento de Estado del Gobierno de los Estados Unidos de América. Manual de Agricultura Núm. 335. SOFFER, S. DE R. L. México. 150 p.
14. Santiesteban-Hernández. A., Cuadriello, J. y Loper, G. 2003. Comparación de Parámetros Físico-químicos de Mieles de Abejas sin Aguijón y *Apis mellifera* de la Región del Soconusco, Chiapas, México. III Seminario Mesoamericano sobre Abejas sin Aguijón. Tapachula, Chiapas, México.

15. Zully M. 1991. Determinación de los Patrones de Inhibición de Propóleos de diferentes regiones del país, sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Guatemala: Universidad de San Carlos. 32p. (Tesis de Graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia).
16. Villanueva, R. Et, al.. 2003 La Meliponicultura, una Tradición Maya que se Pierde. III Seminario Mesoamericano sobre Abejas sin Aguijón. Tapachula, Chiapas, México, 6-8 de Noviembre del 2003.
17. Vit, P. 1994. "Antibacterial activity properties of stingless bee (Melliponinae) Honey. Venezuela.

ANEXOS