



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA DE PUEBLA**



Facultad de Ciencias Químicas BUAP

**Facultad de Ciencias Químicas
Licenciatura en Químico Farmacobiólogo
Departamento de Análisis Clínicos**

**“Acción antibacteriana de zeolita asociada con propóleo”
(Z-P)**

Tesis para obtener el grado de
Licenciatura en Químico Farmacobiólogo

Presenta

pQ.F.B. Carlos Adolfo Flores Hernández

Director de tesis

M.C Martha Alicia Salgado Juárez

Asesor interno

Dra. Reyna del Consuelo Almiray Pinzón de Dios

Asesor externo

D.C. José Miguel Ángel Hernández Espinosa

PUEBLA, PUE. ENERO, 2020

Dedicatoria

A mis padres Virginia y Adolfo por estar siempre a mi lado con amor y ternura. No me alcanzarían las palabras y pensamientos para expresar lo agradecido que estoy por darme la vida, por enseñarme a caminar, por dar cada gota de sudor y lágrima para llevar un sustento a mi y mis hermanas. A ellos les debo mi vida y mi ser. Sin duda, si Dios mi diera a elegir a mis padres, los elegiría una y mil veces. Los amaré eternamente. Siempre mi ser, mi alma y mi espíritu estará con ustedes.

A mis hermanas Fli y Susi por enseñarme, por estar a mi lado, por apoyarme moral, emocional y económicamente. A ustedes, las amaré siempre, nunca las cambiaría por nada. Siempre contarán conmigo, nunca las abandonaré.

A mis sobrinos Fleazar y Vale los amo como si fuesen mis hijos. Ahora que son pequeños, espero que Dios me de vida para verlos crecer, estar con ustedes en todo momento de sus vidas, enseñarles, apoyarlos en todo. Deben saber, que siempre tendrán mi apoyo incondicional.

A Nadia, por estar conmigo a lo largo de este tiempo, por apoyarme siempre en todo. La vida cruzo nuestros caminos para un propósito. Tú me enseñaste lo esencial de la vida con tus actos: el amor a la familia, a nuestros seres queridos y lo maravilloso que puede ser la vida cuando de verdad amas.

A la profesora Marthita que siempre me ha apoyado, guiado, y enseñado. En la vida no encontraré alguien como usted, que enseña lo fundamental que cada ser humano debe conocer: la vida, la calidad humana, los sentimientos y los bellos momentos.

A mis amigos y familiares cercanos, ustedes son parte importante en este camino.

Agradecimientos

A mis profesores: Marthita, Reyna, Bedolla, Paty Suarez y Paty Mestiza, sin ustedes, nada de esto hubiese sido posible. Por sus enseñanzas, guías, ayuda, paciencia y apoyo incondicional. A lo largo de la carrera, con altos y bajos aprendí a amar la carrera y la ciencia gracias a ustedes.

Índice

| | |
|---|----|
| • Resumen..... | 6 |
| 1. Introducción | 7 |
| 1.1 Microorganismos bacterianos..... | 7 |
| 1.2 Antibióticos..... | 7 |
| 1.3 Resistencia bacteriana..... | 8 |
| 2. Marco teórico | 11 |
| 2.1 Zeolita..... | 11 |
| 2.2 Propóleos..... | 14 |
| 3. Definición del problema | 19 |
| 4. Justificación | 20 |
| 5. Hipótesis | 20 |
| 6. Objetivos | 21 |
| 6.1 Objetivo general..... | 21 |
| 6.2 Objetivos específicos..... | 21 |
| 7. Diseño de la investigación | 22 |
| 7.1 Tipo de estudio..... | 22 |
| 7.2 Definición del universo..... | 22 |
| 7.3 Tipo de muestreo..... | 22 |
| 7.4 Tamaño de la muestra..... | 22 |
| 7.5 Criterios de inclusión..... | 22 |
| 7.6 Criterio de exclusión..... | 22 |
| 7.7 Criterios de eliminación..... | 22 |
| 8. Metodología | 23 |
| 8.1 Diagrama de trabajo..... | 23 |
| 8.2 Caracterización de zeolita..... | 24 |
| 8.3 Evaluación de propóleos..... | 24 |
| 8.4 Acondicionamiento de la zeolita asociada con propóleo..... | 24 |
| 8.5 Identificación de cepas bacterianas por medios de cultivo convencionales..... | 25 |
| 8.6 Diluciones de zeolita asociada con propóleo..... | 25 |
| 8.7 Difusión en placa..... | 26 |
| 9. Discusión de resultados | 27 |
| 9.1 Caracterización fisicoquímica de zeolita..... | 28 |
| 9.2 Evaluación de calidad de propóleos..... | 30 |
| 9.3 Evaluación fisicoquímica de zeolita asociada con propóleo..... | 31 |
| 9.4 Identificación bacteriana por cultivo convencional..... | 35 |
| 9.5 Diluciones de zeolita con propóleos en solución salina isotónica (SSI)..... | 36 |
| 9.6 Sensibilidad a zeolita asociada con propóleo (Z-P)..... | 36 |
| 10. Conclusión | 39 |
| 11. Propuestas | 40 |
| 12. Referencias | 41 |
| 13. Anexos | 44 |
| 13.1 Tinción Gram..... | 44 |
| 13.2 Inoculación en medios de cultivo..... | 46 |
| 13.3 Pruebas bioquímicas..... | 49 |
| 13.4 Difusión en placa..... | 54 |

Índice de figuras y cuadros

| | Página |
|--|---------------|
| Figura 1. Arreglos tetraédricos de las moléculas de SiO ₄ y AlO ₄ que forman la unidad de la zeolita | 11 |
| Figura 2. Intercambio iónico entre el ion Cs ⁺ y un ion Ca ²⁺ dentro del tetraedro SiO ₄ | 12 |
| Figura 3. Compuestos químicos más representativos presentes en propóleos | 15 |
| Figura 4. Diluciones seriadas de Z-P en SSI | 26 |
| Figura 5. Intensidades de difracción registradas de zeolita | 29 |
| Figura 6. Espectros UV-VIS de la zeolita con propóleo a diferente concentración | 33, 34 |
| | |
| Cuadro I. Especificaciones físicas de los propóleos | 17 |
| Cuadro II. Especificaciones químicas de los propóleos | 18 |
| Cuadro III. Cepas bacterianas por utilizar en el estudio de sensibilidad a Z-P | 22 |
| Cuadro IV. Inoculación de cepas bacterianas en medios de cultivo | 25 |
| Cuadro V. Difusión en placa de cepas bacterianas | 26 |
| Cuadro VI. Composición Química | 28 |
| Cuadro VII. Resultados de las determinaciones de índices físicos y químicos de propóleos | 30 |
| Cuadro VIII. Evaluación física del polvo tópico | 32 |
| Cuadro IX. Pruebas bioquímicas realizadas para bacterias gramnegativas | 35 |
| Cuadro X. Diluciones de Z-P en SSI | 36 |
| Cuadro XI. Resultados de sensibilidad a Z-P por el método de difusión en placa en diez cepas bacterianas | 37 |
| Cuadro XII. Diluciones de Z-P donde se observó sensibilidad | 37 |
| Cuadro XIII. Observación microscópica de cepas bacterianas con tinción Gram en microscopio óptico a un objetivo de 100X | 44 |
| Cuadro XIV. Crecimiento bacteriano en agar Mac Conkey | 46 |
| Cuadro XV. Resultados obtenidos en los agares: Sangre, Sal y Manitol con las cepas correspondientes | 48 |
| Cuadro XVI. Lectura de pruebas bioquímicas de bacterias gramnegativas | 49 |
| Cuadro XVII. Resultados de sensibilidad en cepas bacterianas | 54 |

Resumen

La escasa disponibilidad de antibióticos efectivos, un mayor costo y su control estricto por parte de las farmacéuticas ha propiciado que los pacientes busquen otras alternativas para tratar sus enfermedades. Ante esta problemática surgen una variedad de investigaciones, como la zeolita, que contiene aluminosilicatos y es un material de bajo costo y que al asociarla con propóleo (elemento que se obtiene a partir de la cera elaborada por abejas), presenta características antibacterianas

En este trabajo se investigó el efecto antibacteriano de zeolita en asociación con propóleo (Z-P) en cepas bacterianas proporcionadas por el departamento de microbiología mediante la técnica de dilución en placa (Kirby-Bauer).

De las diez cepas bacterianas utilizadas *Staphylococcus aureus* presentó sensibilidad en una dilución 10^{-3} correspondiendo a un halo de inhibición de 15 mm. Observándose que la zeolita en asociación con propóleo muestra actividad antimicrobiana por lo que puede ser usada como una alternativa para infecciones producidas por *Staphylococcus aureus*. Además, de considerarse un compuesto que cubre los requisitos por ser de fácil acceso para la población, bajo costo y que puede ayudar al tratamiento de la resistencia bacteriana.

1. Introducción

1.1 Microorganismos Bacterianos

Las bacterias son las formas de vida más antiguas, estructuralmente las más simples y las más abundantes sobre la tierra. Son los únicos organismos con organización celular procariota **(Al-mohanna, 2016)**.

Las bacterias presentan una pared celular constituida por una delgada capa de peptidoglucano encontrada entre dos membranas plasmáticas y en otras forman una capa ancha alrededor de la superficie externa de la célula. Siendo clasificadas por medio de la tinción Gram en dos grupos

Bacterias grampositivas: contienen una pared celular con gran cantidad de peptidoglucano y se tiñen de un color morado referente al colorante cristal violeta.

Bacterias gramnegativas: su pared celular contiene menor cantidad de peptidoglucano y se tiñen de color rojo referente al colorante de contraste safranina.

Esta tinción tiene importancia como herramienta diagnóstica ya que permite caracterizar tamaño, forma, agrupación bacteriana, sobre todo en una infección, permitiendo identificar qué tipo de bacteria es la que genera la patología y así aplicar un tratamiento adecuado ya que las bacterias influyen en la resistencia a varios antibióticos, sobre todo a los que actúan sobre la pared de peptidoglicanos.

Las enfermedades infecciosas, en las últimas décadas han generado un alto índice de resistencia a la acción del fármaco, se puede mencionar sobre todo las ocasionadas por las bacterias.

Las infecciones de origen bacteriano son de las causas de enfermedades que afecta a un gran número de personas. Pueden citarse infecciones en vías respiratorias, causadas por *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas* como agentes más comunes **(Solórzano, 2018)**.

1.2 Antibióticos

Los antibióticos se pueden definir como agentes químicos que previenen el crecimiento bacteriano actuando como un bacteriostático o bactericida **(Dugassa & Shukuri, 2017)**. Además, son la parte integral de las medicinas usadas para asegurar la salud humana y animal. En la década de los 40's del siglo XX comenzó el auge de los antibióticos como medicamentos para tratar enfermedades de origen bacteriano. La primera vez que se comercializó a gran escala un fármaco se dio con la penicilina, descubierta por el científico británico Alexander Fleming. Dentro de esta misma década se desarrollaron nuevos antibióticos, como: estreptomycin, cloranfenicol y la aureomicina. En los años

50's surgieron la vancomicina y eritromicina, en los 60's aparecen la gentamicina, ampicilina, cefalotina y amikacina y después del año 2000 surgen las quinolonas de amplio espectro.

Los mecanismos por los que los antibióticos alteran la biología de los microorganismos son los siguientes:

- Inhibición de la síntesis de la pared celular.
- Desorganización de la membrana citoplasmática.
- Inhibición de la síntesis de proteínas.
- Interferencia en la síntesis y/o metabolismo de los ácidos nucleicos.
- Antimetabolitos que bloquean la síntesis de ácido fólico.

A pesar de llevar acabo estos mecanismos contra las bacterias, estas mutan en respuesta al uso constante de estos fármacos. Generando resistencia a los antibióticos, y propagándose a nivel mundial a un ritmo acelerado, siendo hoy una de las mayores amenazas para la salud (**Paredes & Roca, 2004**). Las consecuencias producidas por la disminución en la eficacia de los antibióticos y rápida propagación de multiresistencia originan una mayor estancia hospitalaria, incremento en los costos médico, aumento de la mortalidad, repercusiones en la medicina veterinaria, seguridad alimentaria y en el medio ambiente (**Pérez D. Q., 2017**).

Actualmente y a finales del siglo XX se han investigado estos mecanismos de resistencia que presentan los microorganismos a fármacos con el fin de desarrollar nuevos productos farmacéuticos y naturales que combatan a estos microorganismos y las enfermedades que generan (**Valdés, 2017**).

Sin embargo, resulta difícil realizar investigaciones e invertir en el desarrollo y comercialización de nuevos antibióticos a nivel farmacéutico, debido a la decreciente rentabilidad (mayor resistencia microbiana y esta menor eficacia terapéutica). En consecuencia, las empresas farmacéuticas optan por los medicamentos para tratar enfermedades crónico-degenerativas (**Pérez D. Q., 2017**).

1.3 Resistencia Bacteriana

La resistencia bacteriana se define como aquella en que la bacteria desarrolla un mecanismo que tiene por objetivo lograr disminuir el efecto terapéutico de los antibióticos o agentes antimicrobianos (**Riverón, Hernández, Martínez, & Betarte, 2003**).

Existen dos tipos de resistencia:

- Natural o intrínseca
- Adquirida

De acuerdo con datos de la OMS, las infecciones causan el 25% en todo el mundo y el 45% en países en vías de desarrollo. De igual modo, el 50% de las prescripciones médicas son inapropiadas para tratar infecciones, el 50% de los pacientes compran medicamento solo para un día. Mientras que el 90% lo realiza para tres días o menos.

La OMS ha puesto en marcha la Alianza Mundial para la Investigación y el Desarrollo de Antibióticos, la cual, tiene como objetivo para el año 2023 desarrollar y entregar antibióticos nuevos y mejorados a partir de los ya existentes.

En febrero del año 2017 la OMS da a conocer una lista con los nombres de “patógenos prioritarios” resistentes a los antibióticos. Con el objetivo de guiar y promover la investigación y desarrollo de nuevos antibióticos para combatir el creciente problema mundial de la resistencia a antibióticos. La lista se divide en tres categorías: prioridad crítica, alta o media (**Salud, Resistencia a los antibióticos, 2018**).

Dentro del grupo de prioridad crítica, se incluyen bacterias como: *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Serratia* y *Proteus*.

En niveles alto o medio se encuentran bacterias como: *Staphylococcus aureus* (resistente a meticilina) *Helicobacter pylori*, *Campylobacter spp*, *Saklmonellae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* y *Shigella spp*.

Como se mencionó anteriormente, se han estudiado los mecanismos por los cuales las bacterias adquieren resistencia a los antibióticos, ejemplos de tales mecanismos son:

- Transformación
- Transducción
- Transposición
- Conjugación

La OMS ha propuesto como solución a esta problemática la creación del sistema para la vigilancia mundial de la resistencia antimicrobiana GLASS (Global Antimicrobial Resistance Surveillance System por sus siglas en inglés), en donde, su objetivo principal es documentar los esfuerzos de participación y resultados de los sistemas de vigilancia de resistencia antimicrobiana y datos de resistencia microbiana de los países asociados (**Organization, 2017**). El más reciente reporte de GLASS fue emitido el 29 de enero de 2018 y de los 42 países 40 otorgaron datos de sus sistemas de vigilancia de resistencia antimicrobiana y 22 países entregaron datos de resistencia antimicrobiana como parte del llamado de recopilación de datos por parte de GLASS el 8 de julio del 2017.

Diversos organismos internacionales han proclamado que se realice una amplia investigación para detener el problema de resistencia bacteriana, de entre estos organismos, encontramos: OMS/OPS, la Sociedad Americana de enfermedades infecciosas, CDC y la FDA.

Las directrices de la OMS para prevenir la resistencia establecen usar el antibiótico o medicamento adecuado que demuestre ser efectivo contra un microorganismo en específico. Y en dado caso, utilizar otro medicamento, pero de amplio espectro para combatir la misma infección **(Valdés, 2017)**. Además, establece otros puntos importantes, como:

- Administrar el fármaco el menor tiempo posible.
- Administrarlos por vía parenteral.
- No administrar dos fármacos de una misma familia.
- Verificar el sinergismo de los medicamentos medicados.
- Elegir la dosis y vía adecuada

Los profesionales de la salud tienen responsabilidad directa en la prescripción médica de antibióticos que no corresponden al tratamiento eficaz de infecciones de origen bacteriano. Es por eso, que organizaciones internacionales como las mencionadas anteriormente, proponen cada vez más soluciones para afrontar esta problemática: la recopilación información de los sistemas de salud de los países, investigación en los mecanismos de resistencias y el desarrollo de nuevos compuestos.

Actualmente, existe un requerimiento frecuente en el desarrollo de nuevos tratamientos eficaces contra las infecciones de origen bacteriano. Estos tratamientos con nuevos compuestos pueden involucrar terapias alternas a los antibióticos convencionales **(Cárdenas, Castillo, Cámara, & González, 2018)**.

En la Asamblea de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2015, se determinó la necesidad de un plan de acción global para combatir la resistencia a antimicrobianos, que involucre a países en todas las regiones y que apunte a concientizar y educar sobre la resistencia antimicrobiana, optimizar el uso de los antimicrobianos, reducir la incidencia de la infección hospitalaria y la diseminación de los microorganismos resistentes y asegurar una sostenible inversión para la lucha contra la resistencia antimicrobiana **(Valdés, 2017)**.

Es así como surge la necesidad de generar nuevos productos capaces de actuar sobre los microorganismos que presentan resistencia, unos de estos nuevos elementos los constituyen las zeolitas, así como los propóleos.

2. Marco teórico

2.1 Zeolita

La Asociación Internacional Mineralógica ha definido a la *zeolita* como “sustancia cristalina con una estructura caracterizada por un armazón de tetraedros unidos, cada uno consiste en cuatro átomos oxígeno rodeando un catión (1997). Este armazón contiene cavidades abiertas en forma de canales y jaulas, los cuales están usualmente ocupados por moléculas de agua y los cationes fuera del armazón son comúnmente intercambiables” (Coombs, y otros, 1997).

La zeolita es un mineral hidratado y con forma cristalina conformada por átomos de silicio, aluminio y oxígeno, los cuales, forman una unidad conformacional tetraédrica, donde, el átomo de silicio (Si) o aluminio (Al) ocupa el centro de la molécula rodeado de cuatro átomos de oxígeno (Figura 1) (Moshoeshoe, Nadiye-Tabbiruka, & Obuseng, 2017). Esta estructura se conoce con el nombre de “ion ortosilicato” y contiene cuatro cargas negativas que son estabilizadas por cationes (metales alcalinos o metales alcalinotérreos) que estabilizan la carga del mineral y que pueden ser cambiados por otros iones monovalentes o divalentes. Los cationes más comunes son: sodio (Na), potasio (K) y calcio (Ca).

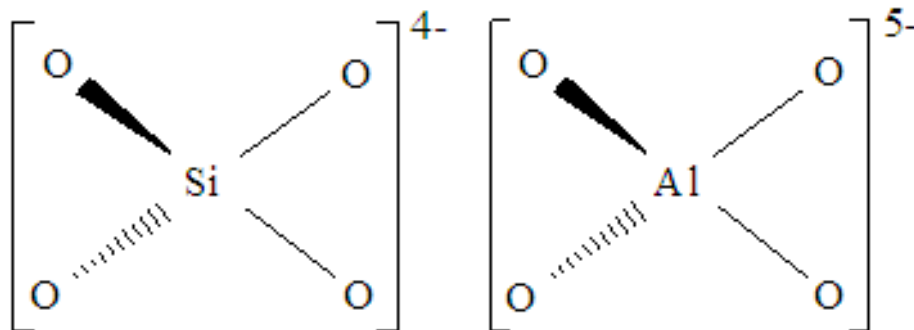


Figura 1. Arreglos tetraédricos de las moléculas de SiO_4 y AlO_4 que forman la unidad de la zeolita.

La capacidad del intercambio iónico depende de la relación silicio/aluminio Si/Al en la estructura, donde, generalmente las zeolitas con una relación reducida de Si/Al tienen una mayor capacidad de intercambio iónico (Demirci, Ustaoglu, Yilmazer, Sahin, & Baç, 2014).

Existen diversos grupos de zeolita (clinoptilolita, analcimas, natrolitas, filipsitas, heulanditas, modernita, chabasitas, faujasitas, laumontitas y pentasil, que difieren en cuanto a estructura molecular, grado de hidratación y volumen de poro (Bosch, 1997).

La zeolita clinoptilolita (ZC) es un mineral abundante, presente en depósitos naturales y se encuentra disponible a un bajo costo. Tiene las siguientes características: fórmula

molecular: $(\text{Na}, \text{K})_6 (\text{Si}_{30}\text{Al}_6\text{O}_{72}) \cdot 20\text{H}_2\text{O}$, una relación Si/Al de 4.0 a 5.7 y una capacidad de intercambio iónico de 2.0 a 2.6 meq/g de zeolita (**Moshoeshoe, Nadiye-Tabbiruka, & Obuseng, 2017**).

Comparte una alta similitud con la estructura de zeolita heulandita. Las características que diferencian a estas dos zeolitas es el mayor radio y soporte a altas temperaturas de clinoptilolita (**Pavelić, y otros, 2018**).

El siguiente esquema corresponde a la estructura general de ZC compuesta por tetraedros de SiO_4 , en donde, se indica el intercambio iónico que puede ocurrir al entrar en contacto con un ambiente que propicie este intercambio o con un material a fin. También dependerá de la relación Si/Al de clinoptilolita (**Figura 2**) (**Pavelić, y otros, 2018**).

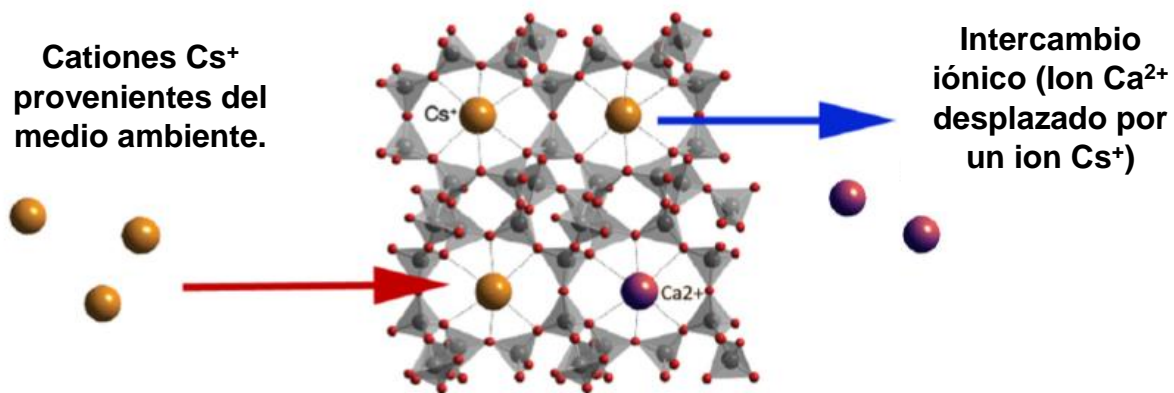


Figura 2. Intercambio iónico entre el ion Cs^+ y un ion Ca^{2+} dentro del tetraedro SiO_4 .

Este mineral cuenta con propiedades y mecanismos de acción en el cuerpo humano están aún en investigación esta zeolita. Posee tres características que lo distinguen primordialmente:

1. Intercambiador iónico.
2. Adsorbente
3. Agente desintoxicante.

Actualmente, las ZC tienen una amplia variedad de aplicaciones: enfocándose en el intercambio iónico entre metales pesados presentes en aguas residuales, alimento para ganado, en este último ha permitido un mayor aprovechamiento del alimento. También en el área de agricultura como filtro y absorbente.

Además, se han realizado una amplia serie de investigaciones que involucran el uso de zeolita clinoptilolita en el área de la salud; tales investigaciones se enfocan en: su efecto inmunomodulador, coadyuvante antitumoral, antioxidante efecto sobre microbiota y patógenos, donador de minerales, agente desintoxicador e impacto sobre el intestino. Así mismo se han documentado efectos específicos en animales y humanos al proveerles de Clinoptilolita en forma de polvo como suplemento, estos efectos son:

1. Agente desintoxicante
2. Antioxidante
3. Donador de oligoelementos
4. Microbiota de apoyo

Es sabido que los silicatos y aluminosilicatos poseen actividad biológica, ya sea, positiva o negativa. Estudios recientes han demostrado que los depósitos naturales encontrados en Cuba de ZC biológicamente no tóxica es muy eficiente en la adsorción de glucosa, también como agente antidiarreico y como regulador del sistema inmune, etc. **(Paveli, y otros, 2000)**.

En investigaciones anteriores la ZC se ha usado en asociación a metales como lo son: plata, cobre, zinc, etc. en cepas bacterianas **(Hrenovic, Milenkovic, Goic-Barisic, & Rajic, 2012)**

Investigaciones en el uso modificado de ZC con plata y cobre sobre cepas aisladas de *Acinetobacter baumannii*, mostraron sensibilidad a diferentes concentraciones mínimas inhibitorias de la ZC modificada. Este estudio reporta el efecto antimicrobiano de ZC en asociación a cationes es debido a la filtración y/o liberación de estos por parte de la ZC **(Hrenovic, Milenkovic, Goic-Barisic, & Rajic, 2012)**.

Se observó que las zeolitas intercambiada con iones plata exhibieron mayor actividad bactericida con respecto a otras zeolitas modificadas con metales/iones. Estas observaciones dan soporte a que varias zeolitas sintéticas pueden ser intercambiadoras de iones plata (Ag^+), cobre (Cu^{2+}) y zinc (Zn^+) para adquirir propiedades antimicrobianas o características como: liberadores de iones con el objetivo de proveer una actividad prolongada o más fuerte. Metales como la plata, cobre y zinc son los metales más importantes usados por su eficiente actividad antimicrobiana. En diversos estudios, han sido reportados con actividad biocida sobre bacterias gramnegativas, grampositivas, levaduras y hongos **(Demirci, Ustaoglu, Yilmazer, Sahin, & Baç, 2014)**.

Así mismo, se ha encontrado actividad antibacteriana de zeolita NaY modificada con diferentes concentraciones de 3-aminopropiltriétoxosilano en su superficie contra cepas bacterianas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* por la técnica de difusión en disco **(Hanim, y otros, 2015)**.

Otra investigación que ha demostrado el efecto antimicrobiano de zeolita modificada fue realizada en Turquía, en el cual, se reporta lo siguiente: “el comportamiento antimicrobiano de zeolita X antes y después del proceso de encapsulación fueron investigados por el método de difusión en disco. Las muestras de zeolita cargadas con iones cobre (Cu^{2+}) y iones zinc (Zn^{2+}) mostraron una excelente actividad antimicrobiana en contra de tres bacterias: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, una levadura *Candida albicans* y un hongo *Aspergillus niger* **(Tekin & Bac, 2016)**.

Considerando estas propiedades, las zeolitas tienen un gran número de aplicaciones como puede ser las farmacéuticas y ser utilizada como agente antibiótico.

Una zeolita modificada ha demostrado mayor efecto potencial para la actividad propuesta, es así como en este trabajo se propuso la acción de una zeolita modificada con propóleos.

2.2 Propóleos

Los propóleos se definen como *“sustancias resinosas, apícolas, con características físicas y químicas que dependen de la zona geográfica donde se encuentre. Es transformado y colectado por las abejas melíferas Apis mellifera”* (Peña, 2008).

Una segunda definición de propóleos es otorgada por la **NOM-003-SAG/GAN-2017** “Propóleos producción y especificaciones para su procesamiento”, en la cual, definen como:

“Nombre genérico que se da a las sustancias resinosas recolectadas y procesadas por las abejas de la vegetación circundante al apiario. De aspecto resinoso, su color puede variar dependiendo de su origen desde el rojo, amarillo-rojizo, amarillo-oscuro, verde castaño, pardo o negro, con sabor amargo y ligeramente picante”.

Este producto ha sido utilizado como medicina alternativa con registro desde el periodo neolítico (4000 a 6000 años A.C) (Salmón, 2014). Además, se ha usado como tratamiento contra infecciones de vías respiratorias, ulcera gástrica, dolor de garganta y contra quemaduras y heridas (Bankova, 2006).

Además de las propiedades terapéuticas antes mencionadas se han reportado los posibles efectos antineoplásicos, antimicrobianos, antiinflamatorios y antioxidantes, Sin embargo, se requieren más estudios que corroboren esta información al igual que estudios toxicológicos y alergénicos (Menezes, 2005).

Desde el año 2002 se han identificado más de 300 componentes químicos presentes en los propóleos de diferentes orígenes (Castaldo & F.Capasso, 2002). Así mismo, los diferentes tipos de propóleos presentan diversas propiedades químicas y farmacológicas.

La composición química de los propóleos depende de tres factores importantes:

1. Zona geográfica de la flora.
2. Condiciones climáticas.
3. Componentes de la planta que se usan como base para sintetizarlo.

De entre los derivados de las plantas para sintetizar a los propóleos, se encuentran: secreciones y exudados de heridas de plantas, materiales lipofílicos sobre las hojas y resinas (Bankova, 2006). Además, la composición en general de los propóleos en bruto consiste en: resinas 50-55%, ceras 30-40% (no poseen actividad terapéutica probada),

aceites esenciales 5-10%, polen 5% y sustancias orgánicas y minerales en un 5%. Dejando de lado la cera presente en los propóleos, las demás sustancias presentes poseen actividad biológica **(Salmón, 2014)**.

De entre los componentes encontrados se mencionan a los flavonoides, terpenos: acacetina, ácido cinámico, cumarina, galangina, izalpina, kaempferido pinocembrina, prenilletina, viscidona y vanillina. En la **figura 3** se muestran los compuestos químicos más representativos en todos los propóleos **(Muñoz, Peña, Ureta, & Montenegro, 2001)**.

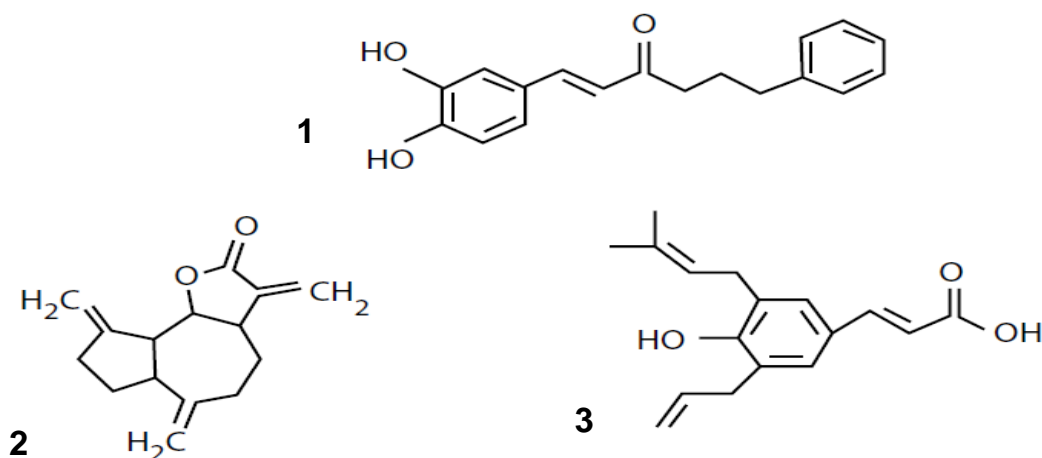


Figura 3. Compuestos químicos más representativos presentes en propóleos.

1. Feniletíl éster del ácido cafeico,
2. Dihidrocostus-lactona.
3. Ácido 3-[4-hidroxi-3,5-bis(3-metil-2-butenil) fenil]-2(E)-propenoico **(Nakanish, y otros, 2003)**.

Las propiedades biológicas de los propóleos que se definen a partir de su composición química se explican de la manera siguiente:

- Efecto antioxidante: debido en gran medida por la presencia de flavonoides (principalmente del feniletíl éster del ácido caféico) son capaces de eliminar radicales libres.
- Efecto antibacteriano: compuestos flavonoides como galangina y pinocembrina y derivados del ácido benzoico, ferúlico y caféico. Se menciona en investigaciones anteriores que el ácido cinámico es el responsable del efecto antibacteriano contra la cepa de *Staphylococcus aureus* meticilina resistente. También en contra de *Helicobacter pylori*, en la cual actúan la pinocembrina, galangina y la crisina (compuestos fenólicos).

- Acción antiviral: en estudios anteriores se demostró que reducía la síntesis de ADN, nuevamente por efecto de los flavonoides.
- Fungicida: la cepa con mayor sensibilidad ha sido *Rhodotorula spp.*
- Cicatrizante y antiinflamatorio: se ha señalado al ácido cafeico con actividad reductiva en la producción de prostaglandinas e interleucinas, que actúan como mediadoras de la inflamación.
- Anestésico: experimentos demostraron la actividad anestésica en conejos y en corneas de ratones por acción de pinocembrina, esteres del ácido caféico y pinostrobin.
- Inmunomodulador: se ha demostrado que incrementan los linfocitos T, macrófagos y genera una mayor actividad de la fagocitosis
- Antitumoral: en estudios anteriores se han demostrado efectos antitumorales en ratones por acción de los flavonoides **(Salmón, 2014)**.

Hay que mencionar, además los parámetros fisicoquímicos llevados a cabo para el estudio de calidad de propóleos, donde generalmente los propóleos que contienen como límite el 25% de ceras en su composición son de calidad y al sobrepasar tal porcentaje se consideraran de baja calidad. También se estudian los siguientes parámetros:

- Humedad, materia seca y cenizas: porcentaje de agua no mayor al 5%, cenizas no mayores al 1%.
- Resinas y bálsamos: valores entre 50-60%.
- Impurezas mecánicas: porcentajes mayores al 25% se consideran de baja pureza.
- Índice de oxidación: una mayor concentración se ve reflejada en un menor tiempo de decoloración.
- Fenoles y flavonoides totales: se considera de mayor pureza y calidad valores por encima del 10%.

Ante el aumento en la demanda y por ende de la comercialización de los propóleos, los locales naturistas ofrecen los propóleos en diferentes presentaciones farmacéuticas, como, por ejemplo:

1. Cápsulas: ya sea en gel duro (mezclado con polen) o gel blando usualmente mezclado con aceite de soya.
2. Propóleos líquidos: formulado con alcohol, propilenglicol o agua. Se le pueden añadir otros compuestos (miel de abeja, ginseng, jalea real, etc.).
3. Jarabe: mezclado con compuestos dulces, por ejemplo, jarabe de arce, miel, glicerín
4. Pastillas: combinados con azúcar, miel, edulcorantes artificiales, etc.
5. Goma de mascar: chicles patentados para tratamiento de la higiene bucal.
6. Aerosoles: aerosol nasal y aerosoles en solución con alcohol.
7. Cremas: cremas naturales con un porcentaje de propóleos del 1-2%.
8. Ungüentos: cubiertos de grasa vegetal, animal o aceite **(Salmón, 2014)**.

A partir del incremento en la obtención, comercialización y estudio de los Propóleos, se publicó en el Diario Oficial de la Federación (DOF) la **NOM-003-SAG/GAN-2017** “Propóleos producción y especificaciones para su procesamiento”. Esta norma establece los lineamientos específicos con los que deberá contar la producción, almacenamiento y conservación de las características físicas, químicas y microbiológicas de los propóleos.

Así mismo, se mencionan los usos y aplicaciones biológicas de los propóleos son debidas a la presencia de flavonoides y compuestos fenólicos en su estructura molecular, dentro de este último se mencionan: ácido caféico, ácido ferúlico, ácido benzoico y ésteres de ácido caféico, como el CAPE (feniletil éster del ácido cafeico).

De entre los flavonoides que pueden presentarse en el propóleos, y que dicta la misma NOM se encuentran compuestos orgánicos hidroxilados derivados de la 2-fenilbenzopiran-4-ona (2-fenil-4H-cromen-4-ona), y sistemas reducidos en C2-C3 y/o C4 provenientes de exudados vegetales. En el numeral 5 se especifica los criterios físicos, químicos (parámetros cualitativos y cuantitativos) y microbiológicos de los propóleos. **(Cuadro I y II).**

Especificaciones físicas, químicas y actividad antimicrobiana de los propóleos

Cuadro I Especificaciones físicas de los propóleos

| Parámetros | Características |
|-------------------|---|
| Color | Rojo, amarillo-rojizo, amarillo-oscuro, verde castaño, pardo o negro, variando conforme a su origen botánico. |
| Aroma | Resinoso (olor a madera) o balsámico (olor a cera), o balsámico, dependiendo de su origen botánico |
| Sabor | Variable, de suave balsámico, a fuerte y picante, dependiendo de su origen botánico. |
| Consistencia | A temperatura ambiente maleable o rígido, dependiendo de su origen botánico. |

Parámetros de las características físicas de los propóleos en base a la NORMA Oficial Mexicana. NOM-003-SAG/GAN-2017, Propóleos, producción y especificaciones para su procesamiento.

Cuadro II Especificaciones químicas de los propóleos

| Determinación cualitativa | Parámetros |
|-----------------------------------|---|
| Flavonoides | Presencia |
| Fenoles totales | Presencia |
| Índice de oxidación | Máximo 22 segundos |
| Determinación cuantitativa | |
| Compuestos fenólicos | Expresados como equivalentes de ácido gálico: mínimo 5% (peso/peso) |
| Flavonoides | Expresados como equivalentes de quercetina: mínimo 0.5% (peso/peso) |
| Actividad antioxidante (CA50) | Mínimo 100 microgramos/mililitro |

Parámetros de las características químicas de los propóleos en base a la NORMA Oficial Mexicana NOM-003-SAG/GAN-2017, Propóleos, producción y especificaciones para su procesamiento.

Criterios microbiológicos: realizar análisis sobre la actividad antimicrobiana frente a los siguientes microorganismos por ser algunos de los de mayor incidencia en la salud pública. *Staphylococcus aureus* (ATCC), *Escherichia coli* (ATCC), *Candida albicans* (ATCC)

3. Definición del problema

Ante la alta incidencia de resistencia bacteriana que se presenta en todos los niveles de salud como consecuencia del uso irracional de los antibióticos, y ante la escasa investigación para desarrollar antibióticos durante los últimos años, se ha venido presentando una deficiencia en su efecto terapéutico, en consecuencia, las infecciones de origen bacteriano proliferan exponencialmente afectando la calidad de vida del paciente. Por lo que se hace necesario buscar nuevas alternativas que hagan frente a esta situación. Una de estas alternativas es el uso de zeolita asociada con propóleo por las características antimicrobianas que presentan ambos compuestos y también por el bajo costo y fácil accesibilidad a la población.

Pregunta científica

¿Se podrá observar el efecto antibacteriano de zeolita asociada con propóleo en diferentes cepas bacterianas?

4. Justificación

En un reporte emitido por la Organización Mundial de la Salud (OMS) el 5 de febrero de 2018 se establece que los mecanismos de defensa bacteriana ponen en peligro la capacidad de respuesta de la atención sanitaria ante infecciones comunes (**Salud, Resistencia a los antibióticos, 2018**). Así mismo, ha reportado mediante su sistema de vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos GLASS la presencia de resistencia a los antibióticos en muestras de 500,000 personas en 22 países alrededor del mundo. Estos mecanismos de defensa evitan que la bacteria sea destruida por los antibióticos y como consecuencia complican el tratamiento y recuperación del paciente (**Organization, 2017**).

A pesar, de los esfuerzos por la OMS y de los países integrantes, la resistencia a antibióticos sigue en aumento y de seguir la tendencia actual se prevé que para el año 2050 los antibióticos serán totalmente ineficaces para prevenir y tratar enfermedades humanas (**OMS, 2017**).

Ante esta situación que va en aumento en los servicios de salud, se abre la posibilidad de una nueva rama de investigación que permite encontrar formas farmacéuticas alternativas que ofrezcan un efecto terapéutico eficaz y de efecto sostenido que aseguran un tratamiento de mayor calidad en contra de infecciones de origen bacteriano.

5. Hipótesis

Bacterias grampositivas como: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus spp*, *Streptococcus spp* y bacterias gramnegativas: *Escherichia coli*, *Salmonella spp*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella spp*, *Citrobacter spp*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter spp* presentarán sensibilidad ante la presencia de zeolita asociada con propóleo por el método de difusión en placa.

6. Objetivos

6.1 Objetivo general

Identificar la actividad antibacteriana de la zeolita asociada con propóleo (Z-P) en diferentes cepas bacterianas

6.2 Objetivos específicos

- Caracterizar a la zeolita asociada con propóleo (Z-P)
- Identificar las cepas bacterianas a investigar
- Analizar el efecto de Z-P en cepas bacterianas.
- Identificar la cepa bacteriana con mayor sensibilidad

7. Diseño de la investigación

7.1 Tipo de estudio

- Analítico
- Transversal
- Descriptivo
- Prospectivo

7.2 Definición del universo

Bacterias gramnegativas y grampositivas proporcionadas por parte del departamento de microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas de la BUAP

7.3 Tipo de muestreo

Muestreo de conveniencia

7.4 Tamaño de la muestra

En el **Cuadro III** se muestran las cepas bacterianas a utilizar.

Cuadro III. Cepas bacterianas por utilizar en el estudio de sensibilidad a Z-P

| | Bacterias gramnegativas | Bacterias grampositivas |
|---|--------------------------------|--------------------------------|
| 1 | <i>Escherichia coli</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> |
| 2 | <i>Klebsiella spp</i> | <i>Streptococcus pyogenes</i> |
| 3 | <i>Salmonella spp</i> | <i>Bacillus spp</i> |
| 4 | <i>Proteus mirabilis</i> | |
| 5 | <i>Enterobacter spp</i> | |
| 6 | <i>Citrobacter spp</i> | |
| 7 | <i>Pseudonomas aeruginosa</i> | |

7.5 Criterios de inclusión

- Cepas bacterianas disponibles en el cepario del departamento de microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas.
- Cepas bacterianas no exigentes.

7.6 Criterios de exclusión

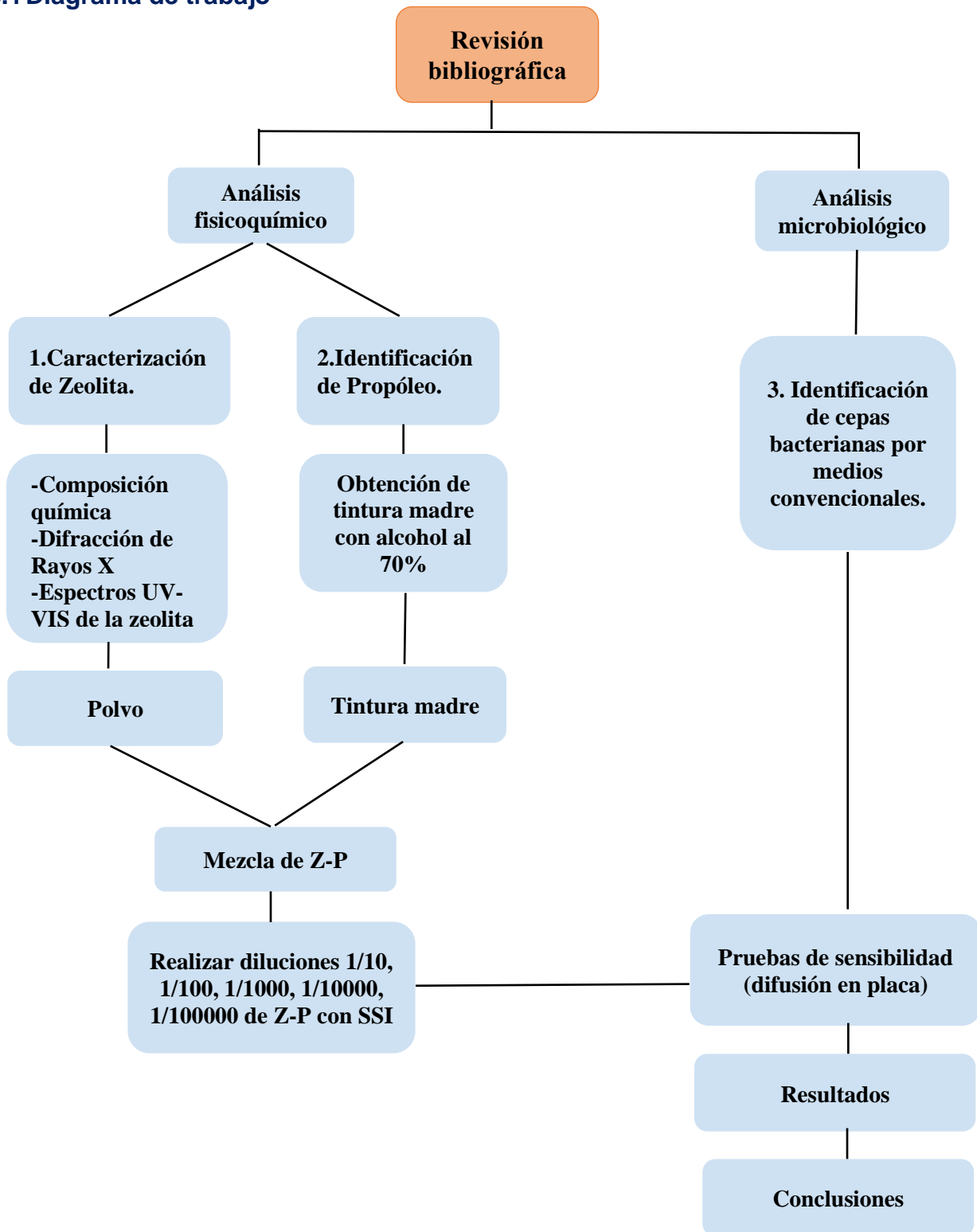
- Cepas bacterianas no disponibles en el cepario del departamento de microbiología de la Facultad de Ciencias Químicas.
- Cepas bacterianas exigentes.

7.7 Criterios de eliminación

- Cepas bacterianas no revitalizadas y no disponibles durante la fase experimental.
- Cepas bacterianas contaminadas con otro microorganismo.

8. Metodología

8.1 Diagrama de trabajo



8.2 Caracterización de zeolita

Para el presente trabajo se utilizó una zeolita natural de un mismo lote, proveniente de los yacimientos de la región de Tehuacán, Puebla, México, cuya caracterización fue reportada por el Departamento de Investigación En Zeolitas Del Instituto Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (ICUAP), a cargo del Dr. Miguel Ángel Hernández Espinosa. Los análisis que se realizaron fueron:

- Composición química
- Difracción de Rayos X
- Espectros UV-VIS de la zeolita

8.3 Evaluación de propóleos

La muestra de propóleos fue proveniente de la población de los Tételes con cabecera al municipio de San Juan Ztitlatlacoaya del estado de Puebla, México. Se realizaron ensayos físicos y químicos para evaluar la calidad de los propóleos según la NOM-003-SAG/GAN-2017

- **Preparación de Propóleos**

1. Se pesaron 100 g. de propóleos en bruto previamente triturado.
2. El triturado fue colocado en 100 mL de alcohol al 70%.
3. En un envase de color ámbar, se mantuvo en maceración por 7 días, agitando diariamente por 30 minutos y filtrado.
4. Una vez obtenida la tintura madre se preparó una concentración al 10%.

8.4 Acondicionamiento de la zeolita asociada con propóleo

1. Se pesaron 100 g de zeolita pulverizada y se colocaron en un recipiente de acero inoxidable.
2. Se agregó lentamente 15 mL de la tintura de propóleos al 10% sobre la zeolita, mezclando hasta homogenizar la mezcla.
3. La mezcla fue colocada en una estufa a 40°C durante 60 minutos para obtener el producto completamente seco.

8.5 Identificación de cepas bacterianas por medios de cultivo convencionales

Las cepas fueron proporcionadas por el Departamento de Microbiología de la FCQ-BUAP.

Se realizó la identificación morfológica a través de la tinción gram (**Anexo 13.1**).

- **Inoculación en medios de cultivo**

Las cepas bacterianas fueron inoculadas en medios de cultivo selectivos y enriquecimiento: Mac Conkey, Agar sangre y agar Sal y Manitol (**Cuadro IV**) y (**Anexo 13.2**).

Cuadro IV. Inoculación de cepas bacterianas en medios de cultivo

| Medio de cultivo sólido | Cepa bacteriana |
|-----------------------------|---|
| Agar MacConkey | <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella spp</i> , <i>Enterobacter spp</i> , <i>Salmonella spp</i> , <i>Citrobacter spp</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . |
| Agar Sangre | <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Bacillus spp</i> |
| Agar Sangre y Sal y Manitol | <i>Staphylococcus aureus</i> . |

- **Pruebas Bioquímicas**

Identificación de cepas bacterianas gramnegativas por medio de cinco pruebas bioquímicas: TSI, LIA, MIO, CITRATO y UREA (**Anexo 13.3**).

- **Almacenamiento de cepas bacterianas**

Las cepas bacterianas se almacenaron a 4°C en caldo lactosado en tubos de ensaye previamente rotulados.

8.6 Diluciones de zeolita asociada con propóleo (Z-P)

De la muestra de Z-P se recolectó 1 gramo y se diluyo en 9 mL de SSI. Posteriormente se hicieron cinco diluciones: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} (**Figura 4**).

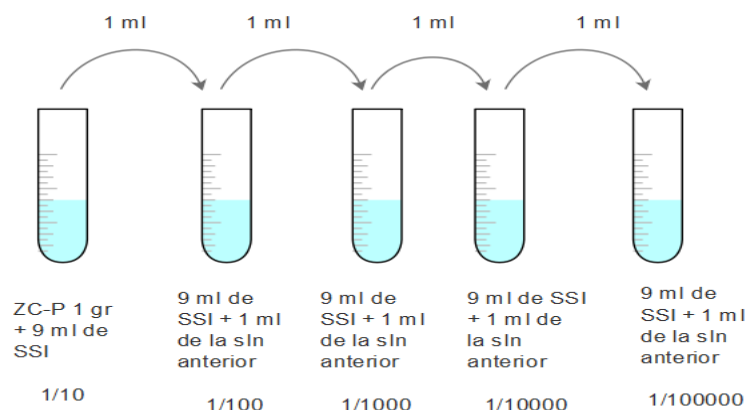


Figura 4 Diluciones seriadas de Z-P en SSI.

8.7 Difusión en placa

El método de difusión en placa es empleado para determinar la sensibilidad de un agente microbiano frente a un antibiótico o quimioterápico. Este método comprende lo que se denomina un antibiograma o prueba de susceptibilidad bacteriana frente a drogas específicas.

Después de que los medios Mueller-Hinton son inoculados con las cepas bacterianas se colocaron los sensibilizadores previamente humedecidos con cada una de las diluciones durante 24 horas y se ordenaron en la placa y se incubaron a 37°C por 24 horas. En el **Cuadro V** se detalla el ordenamiento de los sensibilizadores en la placa.

Cuadro V. Difusión en placa de cepas bacterianas

| Diluciones | Bacteria Inoculada | |
|---|--------------------|---------|
| | Placa A | Placa B |
| 10 ⁻¹ | ✓ | --- |
| 10 ⁻² | ✓ | --- |
| 10 ⁻³ | ✓ | --- |
| 10 ⁻⁴ | --- | ✓ |
| 10 ⁻⁵ | --- | ✓ |
| Controles | | |
| Alcohol 70% (control positivo) | ✓ | ✓ |
| Solución salina isotónica (control negativo) | ✓ | ✓ |

9. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

9.1 Caracterización fisicoquímica de zeolita

- **Composición química**

La composición química nos permite conocer compuestos presentes en los minerales y así poder clasificarlos con base en la presencia o ausencia de estos. La composición química de zeolita (**Cuadro VI**) manifiesta un alto contenido de silicio y aluminio, características propias de esta familia de minerales aluminosilicatos. Así mismo, se logró identificar la concentración en porcentaje peso de la presencia de cationes intercambiables, como: sodio (Na^+), potasio (K^+), magnesio (Mg^{2+}) y calcio (Ca^{2+}), los cuales.

Para la caracterización de la zeolita se contó con los datos reportados previamente (**Porous solid, 2000**). De estos resultados se observa que esta zeolita corresponde a un mayor porcentaje de la especie clinoptilolita y que comparte una estructura química similar a zeolita heulandita con una relación molar Si/Al dentro del rango de 4-5.5 (**Romero, y otros, 2010**).

Cuadro VI. Composición química

| ELEMENTOS | % en Peso |
|-------------------------|-----------|
| SiO_2 | 67.07 |
| Al_2O_3 | 11.31 |
| Si/A | 5.22 |
| CaO | 3.57 |
| Na_2O | 2.90 |
| Fe_2O_3 | 1.21 |
| MgO | 0.68 |
| K_2O | 0.52 |
| *PxC | 13.56 |

Composición química obtenida de la muestra de zeolita, donde se registraron las cantidades en porcentaje de diferentes compuestos característicos de los aluminosilicatos. Pérdidas por calcinación (PxC).

- **Difracción de rayos x**

Uno de los métodos más importantes para identificar a los minerales por los tipos de átomos y posición en la estructura molecular periódica (cristal) es la difracción de rayos x (cristalografía de rayos x). Este método se caracteriza por la difracción que presentan los rayos x que inciden sobre los planos de un cristal y que se representan en un difractograma (**Ramón, 1998**).

El difractograma de zeolita clinoptilolita (**Figura 5**) nos permite apreciar picos de intensidad registrados en dos ejes: la ordenada que especifica la intensidad registrada como “conteos por segundo” (cps) y en la abscisa que se especifica el ángulo 2θ .

Las intensidades registradas corresponden a: 9.9° , 11° , 13° , 17° , 22.5° , 26° , 30° y 32° , las cuales son características de la especie clinoptilolita al compararlas con una muestra estándar del Laboratorio de Zeolitas ICUAP-BUAP.

El difractograma fue reportado por el departamento de Investigación en Zeolitas del ICUAP, a cargo del Dr. Miguel Ángel Hernández Espinosa.

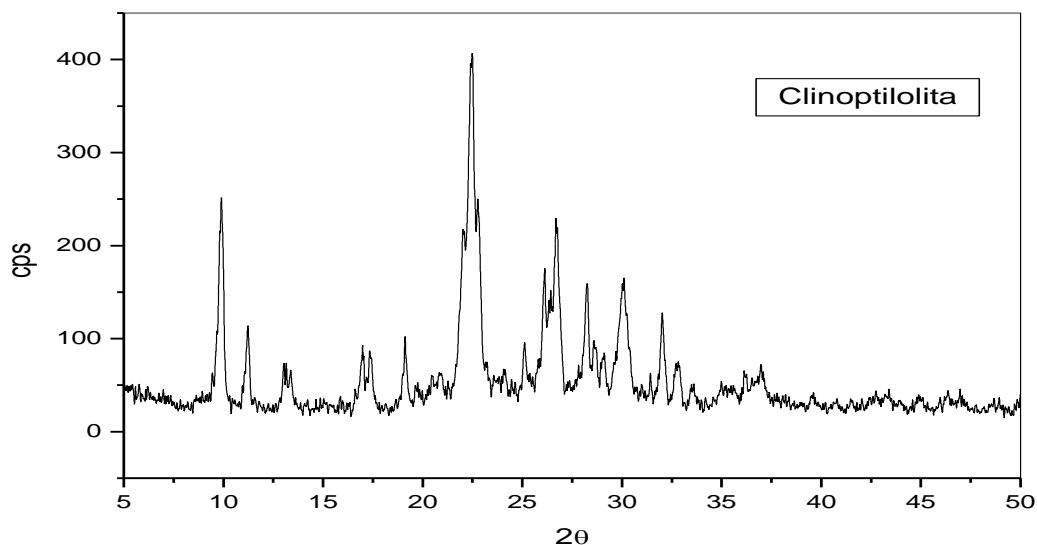


Figura 5 Intensidades de difracción registradas de zeolita.

9.2 Evaluación de calidad de propóleos

El control de calidad del propóleo es necesario para estandarizar su recolección y procesamiento debido al incremento en su comercialización con fines medicinales. La evaluación de calidad del propóleo se realizó con base a la NORMA oficial mexicana **NOM-003-SAG/GAN-2017**, Propóleos, producción y especificaciones para su procesamiento. Los resultados (**Cuadro VII**) de calidad de propóleo en bruto fueron proporcionados por el departamento de Investigación en Zeolitas del ICUAP.

Cuadro VII. Resultados de las determinaciones de índices físicos y químicos de propóleos.

| Determinación de los índices | Valores aceptados | Evaluación |
|--|--|-------------------|
| Aspecto Externo | Granos, briquetas | Corresponde |
| Color | Verde oscuro, pardo o gris, con matices verde, amarillo, castaño oscuro o rojo | Marrón oscuro |
| Sabor | Amargo, fuerte. | Corresponde |
| Estructura | Espesa, con deformaciones heterogéneas. | Corresponde |
| Consistencia | De 20 a 40° C es viscosa, a menos de 20 ° C es dura. | SC |
| Contenido de ceras | No más del 30 % | 18.56 % |
| Incide de oxidación | No mayor de 22 segundos | 8 y 13 segundos |
| Reacción cualitativa ante compuestos flavonoides | Positiva. | Corresponde |

Determinaciones de las características de propóleo, valores aceptados y las evaluaciones obtenidas teniendo como referencia la NOM-003-SAG/GAN-2017.

*SC. Sin cambios

Los propóleos en bruto son obtenidos directamente de la colmena sin ningún tipo de tratamiento previo. De este propóleo, se realizaron ocho determinaciones, de las cuales cinco corresponden a índices físicos; aspecto interno, color, sabor, estructura y consistencia, y tres a índices químicos; contenido de ceras, índice de oxidación y reacción cualitativa ante compuestos flavonoides.

Determinaciones físicas. El aspecto externo de propóleos corresponde a un compuesto sólido, en forma de briquetas y granulado.

El color correspondía a un marrón oscuro casi negro y que en la norma resuelve que el color está asociado directamente al origen botánico del propóleo.

Para el sabor el resultado fue de amargo y fuerte e igualmente depende del origen botánico siendo el sabor fuerte, amargo y picante los prevalecientes.

La estructura obtenida fue espesa con ligeras deformaciones y que se encuentran dentro de los valores aceptados.

Conforme a la consistencia del propóleo a temperatura ambiente (entre 20 y 40°C) y a menos de 20°C el propóleo no presentó cambios significativos. En la norma establece que puede presentar una consistencia suave, maleable o “viscosa” entre 20 y 40°C y rígida a menos 20°C.

Determinaciones químicas. El porcentaje de ceras contenido en los propóleos de esta investigación correspondió a un 18.56%, por lo tanto, se encuentra dentro del intervalo que corresponde a menos del 30%.

El índice de oxidación obtenido fue de 8 y 13 segundos, en la norma dictamina que debe ser como máximo 22 segundos. El resultado registrado nos demuestra una cantidad considerable de fenoles en el propóleo. Recordemos que el índice de oxidación dependerá de la concentración de fenoles en los propóleos, o bien a mayor concentración de fenoles menor tiempo de la reacción.

Por último, la reacción cualitativa ante compuestos flavonoides fue positiva, por la presencia de un color amarillo a naranja al utilizar hidróxido de sodio (NaOH) a una concentración del 20% sobre el propóleo y que corresponde a los valores aceptados en la norma.

9.3 Evaluación fisicoquímica de zeolita asociada con propóleo

El polvo tópico (forma farmacéutica) conformado por zeolita (con mayor porcentaje de la especie clinoptilolita) y propóleo se le realizó determinaciones físicas, se analizaron ocho propiedades de tres muestras recolectadas de forma aleatoria denominadas “muestra 1”, “muestra 2” y “muestra 3” (**Cuadro VIII**). Cabe destacar que las siguientes determinaciones se incluyen dentro de las pruebas reológicas que se realizan para estudiar la fluidez, en este caso, del polvo tópico.

Cuadro VIII. Evaluación física del polvo tópico

| Propiedades | Muestra 1 | Muestra 2 | Muestra 3 |
|-----------------------------|------------------|------------------|------------------|
| Tamaño de partícula (mm) | 0.146 | 0.144 | 0.148 |
| Densidad real (g/mL) | 1.48 | 1.07 | 1.48 |
| Densidad Consolidada (g/mL) | 0.81 | 0.83 | 0.79 |
| Densidad Aparente (g/mL) | 0.46 | 0.49 | 0.51 |
| Porosidad (%) | 68.92 | 54.21 | 65.5 |
| Angulo de reposo: (°) | | | |
| Estático | 0 | 0 | 0 |
| Dinámico | | | |
| Velocidad de flujo: | | | |
| Estático | 0 | 0 | 0 |
| Dinámico | | | |
| Humedad (%) | 2.0 | 2.0 | 2.8 |

Se muestran los resultados del estudio físico obtenido del análisis de tres muestras recolectadas aleatoriamente. Se registraron 7 determinaciones físicas con sus respectivas mediciones.

De las tres muestras se analizaron por orden: el tamaño de partícula en milímetros, los cuales corresponden a 0.146, 0.144 y 0.148 con un promedio de 0.146 mm. Se tiene en cuenta que la Z-P es una forma farmacéutica y que el tamaño de partícula debe estar en un rango menor de 0.150 mm.

Se midieron tres tipos de densidades: real, consolidada y aparente expresadas en gramos por mililitro (g/mL). Las densidades reales obtenidas de las tres muestras corresponden a los valores: 1.48, 1.07 y 1.48 respectivamente con un promedio de 1.34 g/mL.

Con respecto a la densidad consolidada se registraron valores de: 0.81, 0.83 y 0.79 con un promedio de 0.81 g/mL. Por último, la tercera densidad registrada (densidad aparente) se obtuvieron los siguientes datos: 0.46, 0.49 y 0.51 con un promedio de 0.48 g/mL.

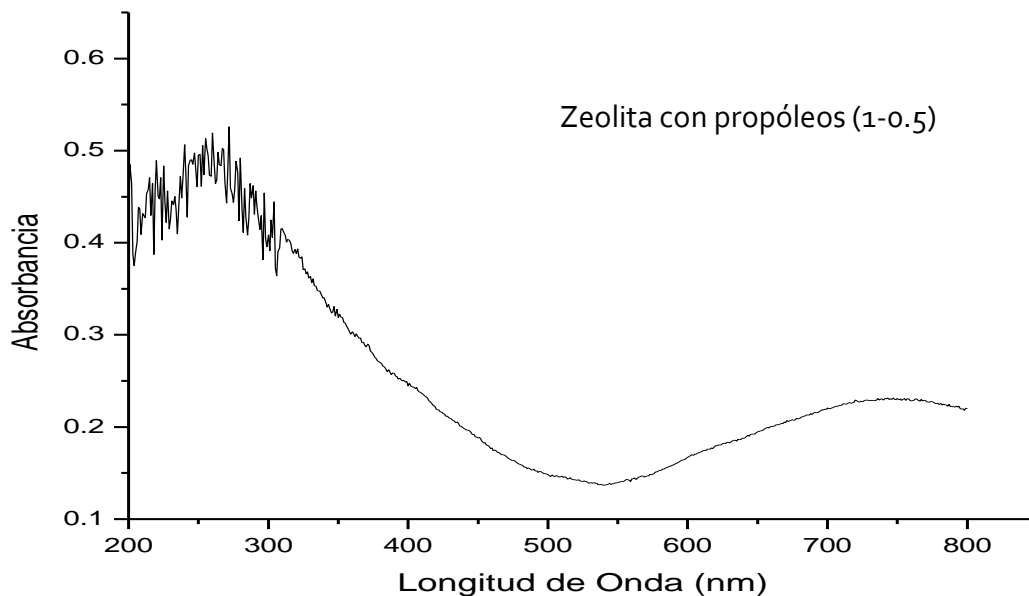
Por otra parte, los valores del porcentaje de porosidad de Z-P registrados son: 68.92%, 54.21% y 65.5% con un promedio porcentual de 62.87%.

Dentro de las propiedades físicas de: ángulo de reposo (estático y dinámico) como la velocidad de flujo (estático y dinámico) no se registraron valores.

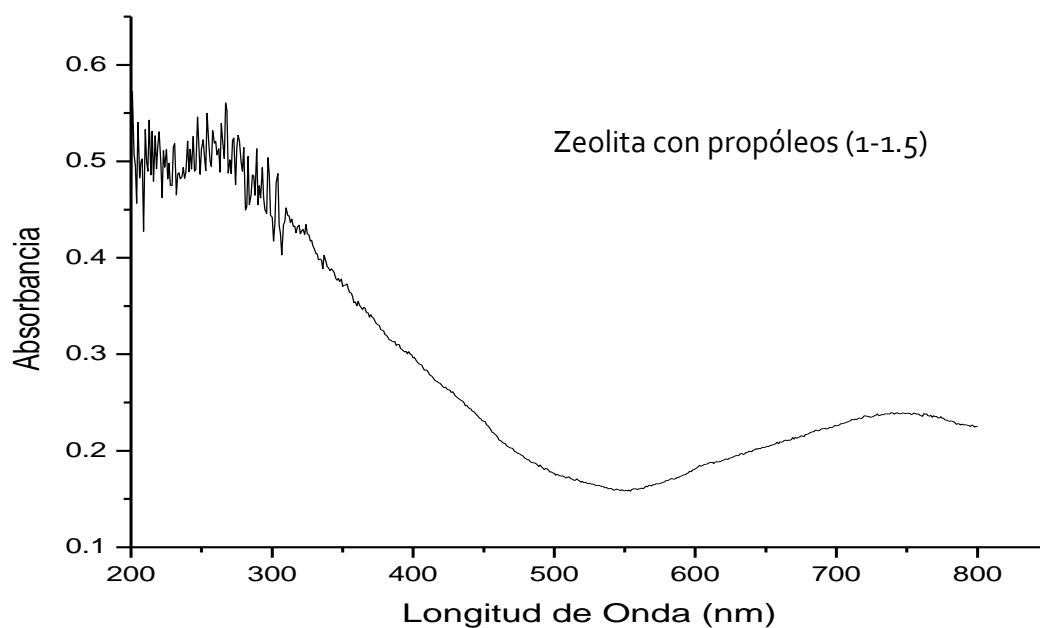
Finalmente, se determinó el porcentaje de humedad de las tres muestras, con valores de: 2.0%, 2.0% y 2.8% con un promedio de 2.26% de humedad.

- **Espectro UV-VIS.**

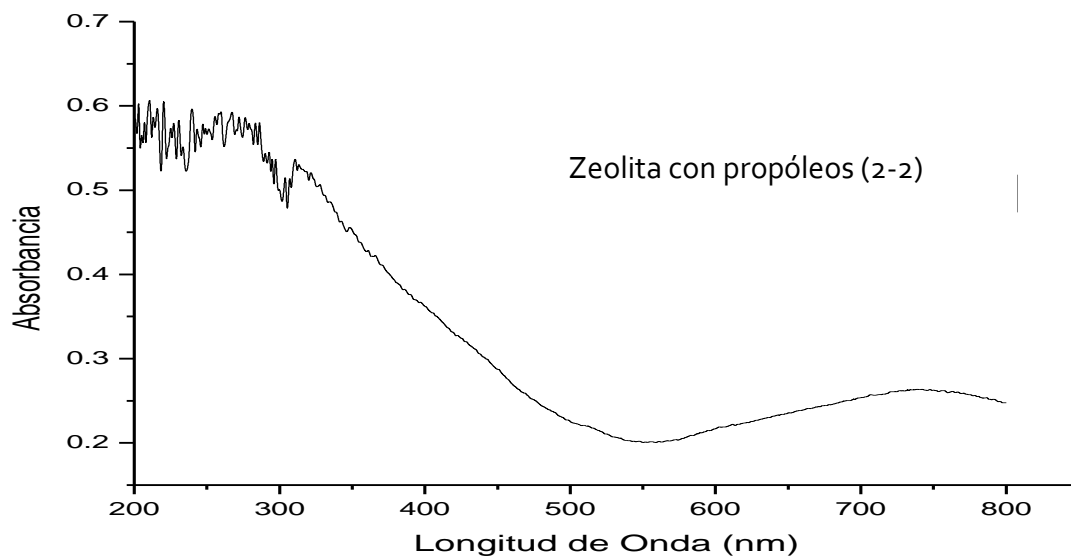
En los espectros UV-VIS de zeolita con propóleos a tres diversas concentraciones (**Figura 6**), se registran los datos obtenidos en dos ejes, el eje de las X nos indica la longitud de onda (nm) y que corresponde al espectro de absorción de la radiación UV-VIS mientras que el eje de las Y nos indica la absorbancia obtenida de la Z-P en función de una longitud de onda específica. El objetivo de los espectros de absorción (en este estudio) es determinar el máximo de absorción a una determinada longitud de onda de Z-P en diferentes concentraciones y que, demuestra que tuvo lugar la asociación entre la zeolita y los propóleos.



a) Espectro UV-VIS de zeolita con propóleos (1:0.5)



b) Espectro UV-VIS de zeolita con propóleos (1-1.5)



c) Espectro UV-VIS de zeolita con propóleos (2:2)

Figura 6. Espectros UV-VIS de la zeolita con propóleo a diferente concentración.

9.4 Identificación bacteriana por cultivo convencional

Se logró identificar a las cepas bacterianas proporcionadas por el Departamento de Microbiología de la FCQ-BUAP por medio del estudio de morfología por tinción Gram (**Anexo 13.1**) crecimiento y reporte de las colonias en medios de cultivo convencionales (**Anexo 13.2**). Además, se realizaron pruebas bioquímicas solo para gramnegativos en esta investigación (**Anexo 13.3**). Las pruebas bioquímicas realizadas fueron: TSI, LIA, MIO, CITRATO y UREA (**Cuadro IX**), las cuales se hicieron bajo las especificaciones de los insertos correspondientes. Estas pruebas bioquímicas son de ayuda en la identificación de especies de bacterias, en este caso de bacterias gramnegativas.

Cuadro IX. Pruebas bioquímicas realizadas para bacterias gramnegativas.

| Microorganismo bacteriano | Pruebas bioquímicas (formas de inoculación) | | | | |
|-------------------------------|---|--------------------------------------|-----|------------------|---------------|
| | TSI (pico y estría en la superficie) | LIA (pico y estría en la superficie) | MIO | CITRATO (estría) | UREA (estría) |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | x | x | x | x | x |
| <i>Proteus mirabilis</i> | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| <i>Salmonella spp</i> | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| <i>Citrobacter spp</i> | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| <i>Escherichia coli</i> | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| <i>Klebsiella spp</i> | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| <i>Enterobacter spp</i> | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ | ✓ |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> | x | x | x | x | x |
| <i>Bacillus spp</i> | x | x | x | x | x |

✓ Se realizó la prueba bioquímica

x No se realizó la prueba bioquímica.

Las correspondientes cepas bacterianas se incubaron 24 horas a 37°C.

También se hizo la prueba de indol con el reactivo de Kovac`s. añadiendo 2 gotas del reactivo sobre la superficie de la prueba bioquímica MIO.

9.5 Diluciones de zeolita con propóleos en solución salina isotónica (SSI)

Las diluciones seriadas de Z-P se realizaron con el fin de encontrar una dilución adecuada que pudiese tener efecto antibacteriano (**Cuadro X**). En la dilución 10^{-1} se observó un exceso de sedimento de Z-P, por lo que se homogeneizó manualmente hasta obtener una dilución lo más homogénea posible con el fin de humedecer los sensibilizadores con las diluciones correspondientes.

Las diluciones fueron conservadas en tubos de ensayo, previamente esterilizadas y almacenadas a una temperatura de 4°C .

Cuadro X. Diluciones de Z-P en SSI

| Diluciones de Z-P | | | | |
|-------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 10^{-1} | 10^{-2} | 10^{-3} | 10^{-4} | 10^{-5} |

9.6 Sensibilidad a zeolita asociada con propóleo (Z-P)

Los resultados obtenidos de sensibilidad a Z-P se muestran en el **Cuadro XI**. Se observa que, de las diez bacterias estudiadas, solo *Staphylococcus aureus* mostró halos de inhibición a Z-P. En el **Cuadro XII** se observa que *Staphylococcus aureus* presentó halos de inhibición en cuatro diluciones de Z-P, las cuales corresponden a las concentraciones: 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} , siendo la concentración en 10^{-3} donde se registró un mayor halo de inhibición de 15 mm.

Muy probablemente esta sensibilidad obedece a la presencia de flavonoides contenidos en los propóleos como efecto antimicrobiano (**Castaldo & F.Capasso, 2002**) y donde, la zeolita con mayor porcentaje de la especie clinoptilolita presenta características de soporte (**Hrenovic, Milenkovic, Goic-Barisic, & Rajic, 2012**).

Además, la zeolita clinoptilolita se ha utilizado en asociación a otros compuestos principalmente metales, y ha demostrado tener efecto antimicrobiano sobre varios microorganismos como bacterias y levaduras (**Hrenovic, Milenkovic, Goic-Barisic, & Rajic, 2012**).

Cuadro XI. Resultados de sensibilidad a Z-P por el método de difusión en placa en diez cepas bacterianas.

| Microorganismo bacteriano | Presencia de halo de inhibición | |
|-------------------------------------|---------------------------------|----|
| | SI | No |
| <i>Proteus mirabilis</i> | | ✓ |
| <i>Salmonella spp</i> | | ✓ |
| <i>Escherichia coli</i> | | ✓ |
| <i>Klebsiella spp</i> | | ✓ |
| <i>Citrobacter spp</i> | | ✓ |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | | ✓ |
| <i>Enterobacter spp</i> | | ✓ |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | ✓ | |
| <i>Bacillus spp</i> | | ✓ |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> | | ✓ |

Se muestra la bacteria grampositiva *Staphylococcus aureus* que mostro sensibilidad ante Z-P en SSI, mediante el método de difusión en placa

Los halos de inhibición se midieron con una regla métrica tomando en consideración los puntos límites. Esta medición se realizó por triplicado.

Cuadro XII. Diluciones de Z-P donde se observó sensibilidad.

| Microorganismo | Dilución | Halo de inhibición (mm) |
|------------------------------|------------------------|-------------------------|
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 10 ⁻² | 10 |
| | 10⁻³ | 15 |
| | 10 ⁻⁴ | 11 |
| | 10 ⁻⁵ | 11 |

El halo de inhibición obtenido en este estudio se comparó con lo publicado en el documento M100 de CLSI tabla 2C, donde se especifican los diámetros de los halos de inhibición que presentan diversas especies de *Staphylococcus* ante varios antibióticos. Dentro de estos, *Staphylococcus. aureus* ATCC 25923 productor de beta-lactamasas presenta sensibilidad por el método de difusión en placa a penicilinas que no son inactivadas por estas enzimas. Donde, la sensibilidad es interpretada por el diámetro de un halo de inhibición ≥29 mm y resistencia por un halo de inhibición ≤28.

Lo anterior indica que la muestra de Z-P debe ser modificada y usar cepas ATCC para obtener resultados favorables que se acerquen a los efectos producidos por antibióticos que se encuentran comercializados.

Por otro lado, los propóleos que han sido investigados por sus aplicaciones medicinales **(Castaldo & F.Capasso, 2002)**, son comercializados ya en diferentes formas farmacéuticas **(Salmón, 2014)** para tratar principalmente infecciones de vías respiratorias altas.

El compuesto obtenido a base de zeolita asociada con propóleo plantea ser un compuesto antibacteriano que tiene como principales características bajo costo, accesible para la población y sin conservadores. Siendo un método alternativo para el tratamiento de infecciones de vías respiratorias altas por *Staphylococcus aureus*.

10. Conclusiones

Con base en el objetivo general y los objetivos específicos se establecen las siguientes conclusiones de este trabajo de investigación.

- La caracterización fisicoquímica de zeolita, propóleo y zeolita asociada con propóleo se logró a través del trabajo del Departamento de Investigación en Zeolitas del Instituto Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (ICUAP).
- Se lograron identificar las diez cepas bacterianas: grampositivas y gramnegativas por medio de cultivo convencional.
- Se logró identificar que la muestra zeolita asociada con propóleo presenta actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*.
- La zeolita asociada con propóleo es un nuevo compuesto alternativo con efecto antibacteriano.

11. Propuestas

1. Emplear siempre cepas bacterianas ATCC.
2. Aumentar las concentraciones de propóleo en zeolita.
3. Utilizar diferentes controles con base en documentos de CLSI.
4. Usar solo microorganismos clasificados en la categoría “prioridad crítica” de la OMS.
5. Trabajar con metales asociados a zeolita puesto que se tiene información que estos metales presentan actividad antimicrobiana.

12. Referencias

- Al-mohanna, M. T. (2016). Bacterial Introduction. *Researchgate*, 680.
- Alós, J.-I. (2015). Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. *Elsevier*, 693.
- Bankova, V. (2006). Recent trends and important developments in propolis research. *Institute of Organic Chemistry with Centre of Phytochemistry, Bulgarian Academy of Sciences, 1113 Sofia*, 29-32.
- Bosch, P. (1997). *La zeolita una piedra que hierve*. México, D.F: Fondo de Cultura Económica.
- Cárdenas, J., Castillo, O., Cámara, C. D., & González, V. (2018). Combatiendo la resistencia bacteriana: una revisión sobre las terapias alternas a los antibióticos convencionales. *Boletín Venezolano de Infectología*, 11-12.
- Castaldo, S., & F.Capasso. (2002). Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*, S1-S6.
- Coombs, D. S., Alberti, A., Armbruster, T., Artioli, G., Colella, C., Galli, E., . . . Ross, M. (1997). *Recommended Nomenclature For Zeolite Minerals: Report Of The Subcommittee On Zeolites Of The International Mineralogical Association, Commission On New Minerals And Mineral Names*.
- Demirci, S., Ustaoğlu, Z., Yilmazer, G. A., Sahin, F., & Baç, N. (2014). Antimicrobial Properties of Zeolite-X and Zeolite-A Ion-Exchanged with Silver, Copper, and Zinc Against a Broad Range of Microorganisms. *Appl Biochem Biotechnol*, 1652-1662.
- Dugassa, J., & Shukuri, N. (2017). Review on antibiotic resistance and its mechanism of development. *Journal of health, health, medicine and nursing*, 1.
- Fair, R. J., & Tor, Y. (2014). Antibiotics and Bacterial Resistance in the 21st Century. *Libertas Academica*, 25.
- Hanim, S. A., Malek, N. A., Ibrahim, Z., Salim, M. M., Ramli, N. I., Sarah, N. S., & Azam, M. A. (2015). Antibacterial Activity of Amine-Functionalized Zeolite NaY against Staphylococcus aureus ATCC6538 and Escherichia coli ATCC11229. *Trans Tech Publications*, 402-406.
- Hrenovic, J., Milenkovic, J., Goic-Barisic, I., & Rajic, N. (2012). Antibacterial activity of modified natural clinoptilolite against clinical isolates. *Elsevier*, 148-152.
- Institute, T. C. (2019). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. Pennsylvania.
- Katwal, R., Kaur, H., Sharma, G., Naushad, M., & Pathania, D. (2015). Electrochemical synthesized copper oxide nanoparticles for enhanced photocatalytic and antimicrobial activity. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 1.
- Klemm, E. J., Wong, V. K., & Dougan, G. (2018). Emergence of dominant multidrug-resistant bacterial clades: Lessons from history and whole-genome sequencing. *National Center for Biotechnology Information*, 12872-12877.
- León-Rosales, S. P., Hernández, R. A., & López-Vidal, Y. (2015). La resistencia a los antibióticos: un grave problema mundial. *Permanyer*, 687.

- Malbrán, D. C. (2012). *Antimicrobianos*. Obtenido de http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2012/11/02-metodo_de_determinacion_de_sensibilidad_antimicrobiana_por_difusion_2012.pdf
- Maravi, J. C. (2016). *Síntesis y caracterización de nanopartículas de cobre por el proceso poliol asistido vía microondas*. Lima: Facultad de Química e Ingeniería Química E.A.P. de Química.
- Menezes, H. (2005). Propolis uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. *Arq. Inst. Biol.*, 72:405-411.
- Monge, M. (2014). Nanopartículas de plata: métodos de síntesis en disolución y propiedades bactericidas. *ResearchGate*, 3.
- Moshoeshoe, M., Nadiye-Tabbiruka, M. S., & Obuseng, V. (2017). A Review of the Chemistry, Structure, Properties and Applications of Zeolite. *American Journal of Materials Science*, 197.
- Muñoz, O., Peña, R. C., Ureta, E., & Montenegro, G. (2001). Propolis of matorral of Central Chile hives. *Z. Naturforsch*, 56c:269-272.
- Muñoz, R. V., & Saquero, A. H. (2014). Nanomateriales con actividad microbicida: una alternativa al uso de antibióticos. *mundonano*, 42.
- Nakanish, I., Uto, Y., Ohkubo, K., Miyazaki, K., Yakumaru, H., Urano, S., . . . Ikota, N. (2003). Efficient radical scavenging ability of artemillin C, a major component of Brazilian propolis, and the mechanism. *Org. Biomol. Chem.*, 1:1452-1454.
- OMS. (2017). *Directrices de la OMS sobre el uso de antimicrobianos de importancia médica en animales destinados a la producción de alimentos*. Ginebra.
- Organization, W. H. (2017). *Global antimicrobial resistance surveillance system (GLASS) report. Early Implementation 2016-2017*. Ginebra.
- Paredes, F., & Roca, J. J. (2004). Acción de los antibióticos. Perspectiva de la medicación antimicrobiana. *Ámbito Farmacéutico. Farmacología*, 118.
- Paveli, K. i., ija, M. H., Bedrica, L., Paveli, J., Điki, I., Kati, M. a., . . . oli, M. (2000). Natural zeolite clinoptilolite: new adjuvant in anticancer therapy. *Researchgate*, -.
- Pavelić, S. K., Medica, J. S., Gumbarević, D., Filošević, A., Pržulj, N., & Pavelić, K. (2018). Critical Review on Zeolite Clinoptilolite Safety and Medical Applications in vivo. *Frontiers in Pharmacology*, 2.
- Peña, R. (2008). Estandarización en propóleos: antecedentes químicos y biológicos. *Ciencia e Investigación agraria*, 17-26.
- Pérez, D. Q. (2017). Resistencia antimicrobiana: evolución y perspectivas actuales ante el enfoque "Una salud". *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 1-13.
- Pérez, J. T. (2005). *Evaluación de las propiedades adsorbentes de una roca zeolítica modificada para la remoción de colorantes azóicos como contaminantes del agua (tesis de pregrado)*. Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca.

- Pettigrew, M. M., Gent, J. F., Revai, K., Patel, J. A., & Chonmaitree, T. (2008). Microbial interactions during Upper Respiratory Tract Infections. *National Center for Biotechnology Information*, 1584-1590.
- Prestinaci, F. (2015). Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. *National Center for biotechnology information*, 310.
- Ramón, B. E. (1998). *identificación y caracterización de la zeolita natural tipo clinoptilolita (Tesis de maestría)*. Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey.
- Riverón, F. F., Hernández, J. L., Martínez, L. M., & Betarte, C. M. (2003). Resistencia bacteriana. *Revista Cubana Médica Militar*, 44-48.
- Román, L. E., Castro, F., Maúrtua, D., Condori, C., Vivas, D., Bianchi, A. E., . . . Gómez, M. M. (2017). Nanopartículas de CuO y su propiedad antimicrobiana en cepas intrahospitalarias. 1-2.
- Romero, M. L., Espinosa, M. Á., Argueta, C. R., Guerrero, M. A., Reyes, R. P., & González, F. R. (2010). Propiedades fisicoquímicas de la clinoptilolita tratada con fertilizantes a usar como aditivo en el cultivo de *Pleurotus ostreatus*. *Terra Latinoamericana*, 247-254.
- Saldivar, R. L., & García-Cerda, L. (2014). Actividad antimicrobial de nanopartículas de cobre y óxido de zinc contra bacterias y hongos fitopatógenos. *Researchgate*, 4.
- Salmón, V. N. (Septiembre de 2014). *El propóleo, otro recurso terapéutico en la práctica clínica*.
- Salud, O. M. (2017). *Lista de las bacterias para las que se necesitan urgentemente nuevos antibióticos*. Ginebra.
- Salud, O. M. (2017). *Sistema mundial de vigilancia de la resistencia a los antimicrobianos. Manual para la primera fase de implementación*. Ginebra.
- Salud, O. M. (2018). *Resistencia a los antibióticos*. Ginebra.
- Sánchez-Sanhuesa, G., Fuentes-Rodríguez, D., & Bello-Toledo, H. (2016). Copper Nanoparticles as Potential Antimicrobial Agent in Disinfecting Root Canals. A Systematic Review. *Int. J. Odontostomat*, 547-554.
- Solórzano, J. W. (2018). Las infecciones bacterianas y su resistencia a los antibióticos. Caso de estudio: Hospital Oncológico "Dr. Julio Villacreses Colmont Solca", Portoviejo. *Universidad y Sociedad*, 220.
- Tekin, R., & Bac, N. (2016). Antimicrobial behavior of ion-exchanged zeolite X containing fragrance. *Elsevier*, 55-60.
- Valdés, M. Á. (2017). La resistencia microbiana en el contexto actual y la importancia del conocimiento y aplicación en la política antimicrobiana. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 402-419.
- Ventola, C. L. (2015). The antibiotic Resistance Crisis. *National Center for Biotechnology Resistance*, 277.
- Vidal, J. E. (2003). Bacterias patógenas y el ser humano. La importancia de la virulencia bacteriana. *researchgate*, 9.

13.ANEXOS

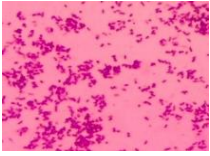
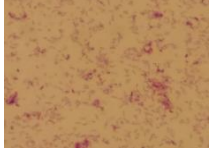
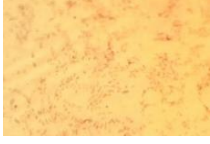
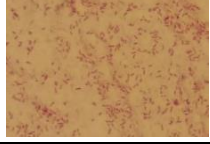
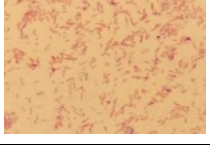
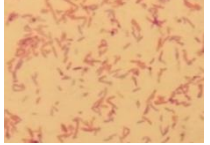
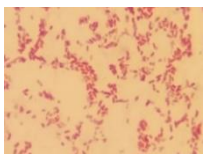
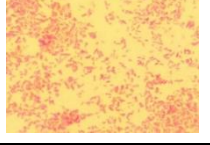

13.1 Tinción Gram

Las bacterias observadas correspondían dentro de la clasificación de gramnegativas y grampositivas con morfología: cocobacilos, bacilos y cocos en racimos de uvas. En el **Cuadro XIII** se muestra la morfología y clasificación Gram de cada bacteria utilizada en este estudio.

Procedimiento

1. Se colocó una gota de solución salina isotónica sobre un portaobjetos, y de cada cepa se tomó una colonia.
2. Se fijó la muestra pasándola por el mechero bunsen rápidamente 3 veces.
3. Se agregó a cada una de las muestras el cristal violeta durante 1 minuto.
4. Se añadió lugol por un minuto.
5. Se agregó alcohol-cetona por 30 segundos.
6. Finalmente se agregó la safranina por un minuto.
7. Se dejó secar las muestras durante 10 minutos a temperatura ambiente.
8. Se observó en el microscopio enfocando con el objetivo 100x usando aceite de inmersión.

Cuadro XIII. Observación microscópica de cepas bacterianas con tinción Gram en microscopio óptico a un objetivo de 100X.

| Cepa bacteriana | Descripción | Observación microscópica |
|-------------------------------|---|---|
| <i>Staphylococcus aureus</i> | Cocos en forma de racimos. grampositivos |  |
| <i>Proteus mirabilis</i> | Bacilos gramnegativos |  |
| <i>Salmonella spp</i> | Bacilos gramnegativos |  |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Bacilos gramnegativos |  |
| <i>Citrobacter spp</i> | Bacilos gramnegativos |  |
| <i>Escherichia coli</i> | Bacilos gramnegativos |  |
| <i>Klebsiella spp</i> | Bacilos gramnegativos |  |
| <i>Enterobacter spp</i> | Bacilos Gramnegativos |  |
| <i>Bacillus spp</i> | Bacilos grampositivos |  |

No se presenta la cepa *Streptococcus pyogenes* debido a un escaso crecimiento en la fase de recopilación de imágenes y crecimiento.





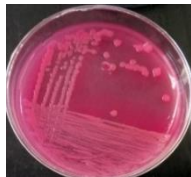
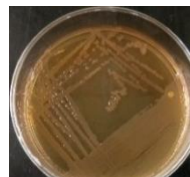
13.2 Inoculación en medios de cultivo

Las bacterias gramnegativas *Escherichia coli*, *Klebsiella spp*, *Enterobacter spp*, *Salmonella spp*, *Citrobacter spp* y *Pseudomonas aeruginosa* fueron sembradas en el medio de cultivo Mac conkey. Los resultados se muestran en el **Cuadro XIV**.

Procedimiento




1. Se sembró por estría cruzada los medios en placa, de Mac Conkey, sangre estos se le picara en el masivo En el caso del Agar Sangre, se perforo tres veces con la misma asa, con el fin de observar la hemólisis.
2. Los medios de cultivo se incubaron por 24 horas a 37° C.
3. Pasando el tiempo de incubación se realizó la lectura del crecimiento bacteriano.
4. Reportando las características macroscópicas de las colonias, tipo de hemólisis en el caso de agar sangre y fermentación de lactosa en agar Mac Conkey.

Cuadro XIV. Crecimiento bacteriano en agar Mac Conkey

| Medio de Cultivo Mac Conkey | | | | | |
|---|---|---|---|--|---|
| <i>Escherichia coli</i> | <i>Klebsiella spp</i> | <i>Enterobacter spp</i> | <i>Salmonella spp</i> | <i>Citrobacter spp</i> | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
|  |  |  |  |  |  |
| Descripción macroscópica y lectura de fermentación de lactosa | | | | | |
| Tamaño: ≈ 1 mm Pigmento: colonias color rosa Forma: puntiforme Elevación: plana Superficie: lisa Aspecto: húmedo | Tamaño: ≈ 1-2 mm Pigmento: colonias color rosa Forma: irregular Elevación: plana Superficie: lisa | Tamaño: ≈ 1 mm Pigmento: colonias incoloras Forma: puntiforme Elevación: convexa Superficie: lisa | Tamaño: ≈ 1 mm Pigmento: colonias incoloras Forma: puntiforme Elevación: plana Superficie: lisa | Tamaño: ≈ 1 mm Pigmento: colonias de color rosa. Forma: circular Elevación: plana Superficie: lisa | Tamaño: ≈ 1 mm Pigmento: colonias incoloras Forma: puntiforme Elevación: plana Superficie: lisa |

| | | | | | |
|-----------------------------------|-----------------------------------|--------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| Bordes: entero | Aspecto: húmedo | Aspecto: húmedo | Aspecto: húmedo | Aspecto: húmedo | Aspecto: seco |
| Luz reflejada: brillante | Bordes: ondulado | Bordes: entero | Bordes: entero | Bordes: entero | Bordes: entero |
| Luz transmitida: opaca | Luz reflejada: brillante | Luz reflejada: mate | Luz reflejada: mate | Luz: reflejada: brillante | Luz reflejada: mate |
| Consistencia: Ligeramente mucoide | Luz transmitida: opaca | Luz transmitida: opaca | Luz transmitida: opaca | Luz transmitida: opaca | Luz transmitida Opaca |
| Olor: sin olor | Consistencia: mucoide | Consistencia: vítrea | Consistencia: vítrea | Consistencia: Vítrea | Consistencia: vítrea |
| Fermentación de lactosa: positivo | Olor: Sin olor. | Olor: ácido | Olor: sin olor | Olor: sin olor | Olor: ligeramente a nixtamal |
| | Fermentación de lactosa: positivo | Fermentación de lactosa: | Fermentación de lactosa: Negativo | Fermentación de lactosa: positivo | Fermentación de lactosa: Negativo |

Cuadro XV.- Resultados obtenidos en los agares: Sangre, Sal y Manitol con las cepas correspondientes

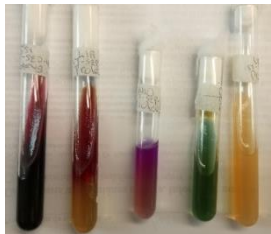
| Medio de Cultivo Sal y Manitol | Medio de Cultivo Sangre | |
|---|--|--|
| <i>Staphylococcus aureus</i> | <i>Streptococcus pyogenes</i> | <i>Bacillus spp</i> |
|  |  |  |
| Descripción macroscópica | | |
| <p>Tamaño: ≈1 mm</p> <p>Pigmento: colonias color amarillo</p> <p>Forma: puntiforme</p> <p>Elevación: plana</p> <p>Superficie: lisa</p> <p>Aspecto: seco</p> <p>Bordes: entero</p> <p>Luz reflejada: brillante</p> <p>Luz transmitida: opaca</p> <p>Consistencia: suave</p> <p>Olor: sin olor</p> <p>Fermentación de manitol: positivo</p> | <p>Tamaño: ≈ 1 mm</p> <p>Pigmento: colonias incoloras</p> <p>Forma: puntiformes</p> <p>Elevación: plana</p> <p>Superficie: lisa</p> <p>Aspecto: húmedo</p> <p>Bordes: ondulado</p> <p>Luz reflejada: brillante</p> <p>Luz transmitida: opaca</p> <p>Consistencia: suave</p> <p>Olor: Sin olor</p> <p>Hemolisis: beta</p> | <p>Tamaño: 2-3 mm</p> <p>Pigmento: colonias grises</p> <p>Forma: irregulares</p> <p>Elevación: elevada</p> <p>Superficie: rugosa</p> <p>Aspecto: húmedo</p> <p>Bordes: irregulares</p> <p>Luz reflejada: brillante</p> <p>Luz transmitida: opaca</p> <p>Consistencia. Mucoide</p> <p>Olor: sin olor</p> <p>Hemolisis: completa</p> |


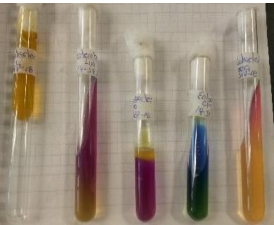
13.3 Pruebas bioquímicas



Se identificaron las bacterias gramnegativas (enterobacterias) por medio de cinco pruebas bioquímicas (TSI, LIA, MIO, CITRATO y Urea), Los resultados e interpretaciones se registran en el **Cuadro XVI**.



1. Las cepas bacterianas fueron recolectadas del medio donde fueron inoculadas con apoyo del asa bacteriológica (terminación en punta).
2. Una vez recolectadas, dentro del área estéril proporcionada por el límite del mechero Bunsen, serán inoculadas en las cinco pruebas bioquímicas.
3. En TSI y LIA, la inoculación se realiza por punción profunda y estría en forma de “cola de ratón” en la parte superficial de los medios. En MIO, solo se realiza una punción profunda y en CITRATO Y UREA solo se realiza una estría en forma de “cola de ratón”.
4. Una vez inoculadas y rotuladas las pruebas bioquímicas se incuban a una temperatura de 37° Celsius durante 24 horas.

Cuadro XVI. Lectura de pruebas bioquímicas de bacterias gramnegativas.

| Cepa bacteriana | TSI | LIA | MIO | CITRATO | UREA |
|---|--|---|---|--|------------------------------|
| <i>Proteus mirabilis</i>  | K/A | Violeta/amarillo | Movilidad: | Producción de citrato permeasa: | Producción de ureasa: |
| | Crecimiento: Positivo Producción de ácido sulfhídrico: Positivo Producción de gas: Positivo Fermentación de: Glucosa: Positivo Lactosa: Negativo Sacarosa: Negativo | Crecimiento: Positivo Producción de ácido sulfhídrico: Negativo Descarboxilación de lisina: Negativo Desaminación de lisina: Positivo | Positivo Ornitina descarboxilasa Positivo Indol: Negativo | Negativo | Negativo |

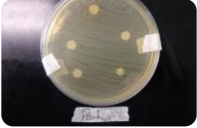
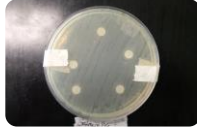
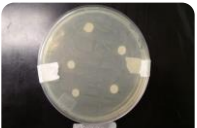

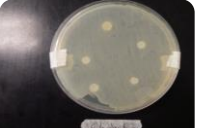
| | | | | | |
|--|--|--|---|--|--|
| <p style="text-align: center;"><i>Klebsiella spp</i></p>  | <p style="text-align: center;">A/A</p> <p>Crecimiento: Positivo</p> <p>Producción de ácido sulfhídrico: Negativo</p> <p>Producción de gas: Positivo</p> <p>Fermentación de: Glucosa: Positivo Lactosa: Positivo Sacarosa: Positivo</p> | <p style="text-align: center;">Violeta/violeta</p> <p>-Crecimiento: Positivo</p> <p>-Producción de ácido sulfhídrico: Negativo</p> <p>Descarboxilación de lisina: Positivo</p> <p>-Desaminación de lisina: Negativo</p> | <p>-Movilidad: Positivo</p> <p>-Ornitina descarboxilasa Negativo</p> <p>-Indol: Negativo</p> | <p>Producción de citrato permeasa: Positivo</p> | <p>Producción de ureasa: Positivo</p> |
| <p style="text-align: center;"><i>Enterobacter spp</i></p>  | <p style="text-align: center;">A/A</p> <p>Crecimiento: Positivo</p> <p>Producción de ácido sulfhídrico: Negativo</p> <p>Producción de gas: Positivo</p> <p>Fermentación de: Glucosa: Positivo Lactosa: Positivo Sacarosa: Positivo</p> | <p style="text-align: center;">Violeta/amarillo pálido</p> <p>Crecimiento: Positivo</p> <p>Producción de ácido sulfhídrico: Negativo</p> <p>Descarboxilación de lisina: Negativo</p> <p>Desaminación de lisina: Negativo</p> | <p>Movilidad: Positivo</p> <p>Ornitina descarboxilasa Positivo</p> <p>Indol: Negativo</p> | <p>Producción de citrato permeasa: Positivo</p> | <p>Producción de ureasa: Positivo</p> |



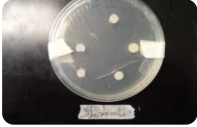
| | | | | | |
|--|--|---|--|--|--|
| <p><i>Salmonella spp</i></p>  | <p>K/A</p> <p>Crecimiento: Positivo</p> <p>Producción de ácido sulfhídrico: Positivo</p> <p>Producción de gas: Positivo</p> <p>Fermentación de: Glucosa: Positivo Lactosa: Negativo Sacarosa: Negativo</p> | <p>Violeta/violeta</p> <p>-Crecimiento: Positivo</p> <p>-Producción de ácido sulfhídrico: Negativo</p> <p>Descarboxilación de lisina: Positivo</p> <p>-Desaminación de lisina: Negativo</p> | <p>Movilidad: Positivo</p> <p>-Ornitina descarboxilasa Positivo</p> <p>-Indol: Negativo</p> | <p>Producción de citrato permeasa: Positivo</p> | <p>Producción de ureasa: Negativo</p> |
| <p><i>Pseudomonas aeruginosa</i></p>  | <p>K/K</p> <p>Crecimiento: Positivo</p> <p>Producción de ácido sulfhídrico: Negativo</p> <p>Producción de gas: Negativo</p> <p>Fermentación de: Glucosa: Negativo Lactosa: Negativo Sacarosa: Negativo</p> | <p>Violeta/amarillo</p> <p>Crecimiento: Positivo</p> <p>Producción de ácido sulfhídrico: Negativo</p> <p>Descarboxilación de lisina: Positivo</p> <p>Desaminación de lisina: Negativo</p> | <p>Movilidad: Negativo</p> <p>Ornitina descarboxilasa Positivo</p> <p>Indol: Negativo</p> | <p>Producción de citrato permeasa: Positivo</p> | <p>Producción de ureasa: Negativo</p> |

| | | | | | |
|--|---|--|---|--|--|
| <p><i>Citrobacter freundii</i></p>  | <p>A/A</p> <p>Crecimiento: Positivo</p> <p>Producción de ácido sulfhídrico: Positivo</p> <p>Producción de gas: Positivo</p> <p>Fermentación de: Glucosa: Positivo Lactosa: Positivo Sacarosa: Positivo</p> | <p>Violeta/amarillo</p> <p>-Crecimiento: Positivo</p> <p>-Producción de ácido sulfhídrico: Negativo</p> <p>Descarboxilación de lisina: Negativo</p> <p>-Desaminación de lisina: Negativo</p> | <p>-Movilidad: Positivo</p> <p>-Ornitina descarboxilasa Negativo (v)</p> <p>-Indol: Negativo</p> | <p>Producción de citrato permeasa: Positivo</p> | <p>Producción de ureasa: Negativo</p> |
| <p><i>Escherichia coli</i></p>  | <p>A/A</p> <p>Crecimiento: Positivo</p> <p>Producción de ácido sulfhídrico: Positivo (escaso)</p> <p>Producción de gas: Negativo</p> <p>Fermentación de: Glucosa: Positivo Lactosa: Positivo Sacarosa: Positivo</p> | <p>Violeta/violeta</p> <p>Crecimiento: Positivo</p> <p>Producción de ácido sulfhídrico: Negativo</p> <p>Descarboxilación de lisina: Positivo</p> <p>Desaminación de lisina: Negativo</p> | <p>Movilidad: Positivo</p> <p>Ornitina descarboxilasa Positivo</p> <p>Indol: Positivo</p> | <p>Producción de citrato permeasa: Negativo</p> | <p>Producción de ureasa: Negativo</p> |

13.4 Difusión en placa

Cuadro XVII. Resultados de sensibilidad en cepas bacterianas

| Cepa bacteriana | Halos de inhibición |
|--|---|
| <p><i>Proteus mirabilis</i></p>  | <p>No presenta halos de inhibición a las 5 diluciones</p> |
| <p><i>Salmonella spp</i></p>  | <p>No presenta halos de inhibición a las 5 diluciones</p> |
| <p><i>Escherichia coli</i></p>  | <p>No presenta halos de inhibición a las 5 diluciones</p> |
| <p><i>Citrobacter spp</i></p>  | <p>No presenta halos de inhibición a las 5 diluciones</p> |
| <p><i>Pseudomonas aeruginosa</i></p>  | <p>No presenta halos de inhibición a las 5 diluciones</p> |
| <p><i>Klebsiella spp</i></p>  | <p>No presenta halos de inhibición a las 5 diluciones</p> |
| <p><i>Enterobacter spp</i></p>  | <p>No presenta halos de inhibición a las 5 diluciones</p> |

| | |
|--|---|
| <p><i>Staphylococcus aureus</i></p>  | <p>Presenta halos de inhibición en los siguientes sensidiscos 10^{-2} (10 mm), 10^{-3} (15 mm), 10^{-4} (11 mm), 10^{-5} (11 mm). En el sensidisco 10^{-1} no presenta halo de inhibición.</p> |
| <p><i>Bacillus spp</i></p>  | <p>No presenta halos de inhibición a las 5 diluciones</p> |
| <p><i>Streptococcus pyogenes</i></p>  | <p>No presenta halos de inhibición a las 5 diluciones</p> |

Medios de cultivo Mueller-Hinton inoculados con las bacterias correspondientes y utilizando los cinco sensidiscos con las diluciones Z-P en SSI, y los controles positivos (Alcohol 70%) y controles negativos (SSI) previamente humedecidos.