

Universidad Nacional
Sistema de Estudios de Posgrado (SEPUNA)
Centro de Investigaciones Apícolas Tropicales (CINAT)
Maestría en Apicultura Tropical (MAT)

Potencial de la miel de *Tetragonisca angustula* y *Scaptotrigona pectoralis* para la formulación de un medicamento antibacteriano y cicatrizante de uso veterinario.

Lic. Martha Arguedas Mora

Trabajo presentado para optar al grado de Máster en Apicultura Tropical. Cumple con los requisitos establecidos por el Sistema de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional.

Heredia, agosto 2021

Tutores:

M.Sc. Eduardo Umaña Rojas
M.Sc. Natalia Fallas Matamoros

Asesor:

PhD. Gabriel Zamora Fallas

Este trabajo se realizó bajo el auspicio del Centro de Investigaciones Apícolas Tropicales (CINAT),
de la Universidad Nacional

AGRADECIMIENTOS

A Ingrid Mora Delgado y Marta Mora Delgado por ser mi apoyo incondicional y llenar mi vida de tanto amor.

A Juan Soto González y MarianyelaRamírez, dosmaravillosas personas que la vida me ha puesto en el camino, y me han apoyado durante este hermoso proceso.

Al PhD. Gabriel Zamora por su invaluable guía y apoyo en la realización de este proyecto.

Al Laboratorio de Microbiología y Química Medicinal QUIMED por brindar los reactivos y suministros para la realización de los ensayos científicos.

Al Centro de Investigaciones Apícolas Tropicales de la Universidad Nacional, y a todo el equipo docente y administrativo.

A la empresa Miel Dorada la Bajura S.A de la cual se obtuvieron la miel para las formulaciones.

RESUMEN

Actualmente, las infecciones causadas por cepas antibiótico resistentes de *Staphylococcus sp.* productoras de biofilms tienen elevada importancia clínica (Zamora et al, 2017). Esto se debe a la protección que les brinda la matriz extracelular (biofilms), ya que protege a las bacterias de los mecanismos de defensa inmunológica del huésped, así como de los agentes antimicrobianos de rutina. Esto motivó la presente investigación, la cual es un emprendimiento donde se crearon 11 fórmulas cuyo principio activo es miel de *Tetragonisca angustula* y/o *Scaptotrigona pectoralis*. Estas fueron sometidas a análisis de carga microbiológica, actividad antimicrobiana, efecto antibiofilms y capacidad antioxidante. Los resultados obtenidos se compararon con dos fármacos; Kruuse Manuka G[®] de uso veterinario y Medihoney[®] de uso humano, las cuales tiene como principio activo miel de *Leptospermum scoparium* (Manuka) de Nueva Zelanda. Los resultados obtenidos superaron a los medicamentos mencionados y demostraron potencial como fármacos en la lucha contra la resistencia antibacteriana; al presentar un amplio espectro antibacteriano de acción, una menor dosis efecto para inhibición del crecimiento del biofilm. Se comprobó que sólo las formulaciones presentan la capacidad de destruir la membrana del biofilm una vez formada. Hallazgos idóneos para la formulación de un fármaco de uso tópico antibacteriano y que favorece la cicatrización de heridas y quemaduras. Se logró estandarizar la capacidad antioxidante en formulaciones cuyo principio activo es la miel de meliponinos.

ÍNDICE GENERAL

Agradecimientos.....	2
Resumen	3
Lista de tablas	5
1. Introducción.....	6
1.1 Justificación	7
1.2 Objetivo General.....	8
1.3 Objetivos específicos	8
2. Marco Teórico.....	9
3. Materiales y Métodos.....	11
3.1 Colecta de muestras	11
3.2 Formulaciones.....	11
3.3 Carga Microbiana.....	11
3.4 Parámetros Fisicoquímicos	12
3.5 Actividad Antimicrobiana.....	12
3.6 Capacidad Antioxidante.....	12
4. Resultados y Discusión	12
5. CONCLUSIONES	22
6. RECOMENDACIONES	23
7. BIBLIOGRAFÍA	24

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Densidad y Humedad de las mieles de <i>Tetragonisca angustula</i> y <i>Scaptotrigona pectoralis</i>	13
Tabla 2. Recuentos microbianos para formulaciones.....	13
Tabla 3. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI, mg/ml) de las formulaciones y los medicamentos Kruuse Manuka G™ y Medihoney® contra cepas ATCC de microorganismos relevantes en infecciones de quemaduras y heridas.....	15
Tabla 4. Efectos de las formulaciones sobre una cepa de <i>S. aureus</i> formadora de biofilms.....	17
Tabla 5. Capacidad antioxidante de las fórmulas en estudio: Contenido fenólico total y valor ORAC.....	19
Tabla 6. Parámetros de selección de los candidatos B y C, para el desarrollo de un producto de uso veterinaria en la curación de quemaduras y heridas.....	21

1. INTRODUCCIÓN.

Las mieles de las abejas nativas sin aguijón han demostrado características y propiedades con aplicación medicinal y terapéutica (van Veen et al, 2019), es por ello que se han realizado diversos estudios de sus características y efectos medicinales. Además, es uno de los alimentos más primitivos utilizados por el ser humano (Cauich et al., 2015).

Su uso data de hace más de mil años por los Mayas en toda Mesoamérica. Ha sido utilizada como medicamento en la curación de patologías oftálmicas, respiratorias, digestivas, carenciales, entre otras. Por ejemplo, en Guatemala predomina el uso de miel de *Tetragonisca angustula*, en el tratamiento para cataratas (Vit et al., 2004).

Biológicamente entendemos por miel como “La sustancia producida por las abejas y otros insectos sociales, a partir del néctar o melazas que ellas recolectan sobre plantas vivas y que transforman o elaboran mediante evaporación de agua y acción de enzimas, segregadas por ellas, quedando almacenada en los alvéolos o celdillas de los panales” (Ulloa et al., 2010)

La composición de la miel depende principalmente del origen de las fuentes botánicas, de la especie de abeja sin aguijón, pero también de factores como suelo, condiciones climáticas, estado fisiológico de la colonia, y tiempo de maduración, las cuales van a repercutir en las características fisicoquímicas de la miel (Do vale et al., 2018).

Con respecto a *Tetragonisca angustula* y *Scaptotrigona pectoralis*, estas son abejas nativas sin aguijón pertenecientes a la tribu meliponini. Las cuales, pueden ser encontradas en las áreas tropicales y subtropicales del mundo desde los 30° de latitud norte hasta los 30° de latitud sur, en Centro y Sudamérica, África, Asia y Australia Roubik (1989), citado por (Nates, 2001).

La miel aplicada tópicamente crea un medio con bajo contenido de agua (alta osmolaridad), lo que permite al plasma y a la linfa migrar hacia la lesión, diluyendo e inhibiendo el crecimiento bacteriano. La linfa, proporciona nutrientes al tejido y la acción de los macrófagos elimina el tejido necrotizado (Dente, 2009).

Se han descrito propiedades antiinflamatorias, anti edematosas y analgésicas, su acidez (por debajo de pH 4) beneficia la acción antibacteriana de los macrófagos, ya que propicia la vacuolización y lisis bacteriana. (Lavandera, 2011).

Las propiedades intrínsecas de la miel, como son: su alta osmolaridad, pH (entre 3,4 y 3,8), una actividad de agua (A_w) baja, entre 0.56 y 0.62, el peróxido de hidrogeno (H_2O_2) producida por la enzima glucosa oxidasa y la presencia de fitoquímicos relacionados al origen botánico de la miel, son características con propiedad inhibitoria para bacterias (Zamora et al., 2011).

1.1 Justificación

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) la muerte por resistencia antimicrobiana puede ascender a 10 millones para el año 2050 (OMS, 2019). Dato alarmante que obliga a la búsqueda de nuevos antimicrobianos con potencial para la destrucción de biofilms. Los microorganismos capaces de generar biofilms, generan un gran obstáculo para la medicina humana y animal a nivel mundial debido al fracaso de la antibioterapia convencional. “Las infecciones por biofilms crecen lentamente, en uno o más lugares, y suelen ser lentas para producir síntomas clínicos evidentes (Costerton et al, 1999) lo que genera fracasos en los tratamientos habituales. Las bacterias clínicamente relevantes por ser formadoras de biofilms que presentan alta patogenicidad se les conoce como ESKAPE, (*Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter spp.*) Rabin et al (2015), citado por (Araujo, 2019).

La evidencia de la susceptibilidad de *Staphylococcus aureus* a la acción bactericida de la miel de abejas sin aguijón y su actividad inhibitoria contra *Pseudomonas aeruginosa* (Zamora et al., 2018), hacen de esta miel, un agente con elevado potencial terapéutico frente a pacientes con infecciones resistentes a fármacos antibacterianos. (Zamora et al., 2011).

Adicional a la actividad antibacteriana, la capacidad de las mieles de abejas sin aguijón de inhibir la formación y destruir los biofilms; permite el ingreso de la antibioterapia en las bacterias previamente protegidas. Esto es un descubrimiento sin precedentes; ya que son pocas las alternativas para tratamiento de infecciones por biofilms (Zamora et al., 2017).

Las mieles de meliponas procedentes de Costa Rica han presentado efecto antimicrobiano igual o mayores al apósito para heridas de miel de manuka, Medihoney®, así como acción inmunomoduladora (Zamora et al, 2015^a) con potencial la curación de heridas al actuar sobre los agentes que median en los procesos inflamatorios.

El estrés oxidativo produce más radicales libres como especies reactivas de nitrógeno y la activación de más células inflamatorias. La acción de la miel de meliponinos promueve el equilibrio en los procesos de oxidación y reducción (Zamora et al, 2015^a).

En Costa Rica, médicos veterinarios de clínicas privadas, así como de instituciones de enseñanza universitaria, han utilizado la miel de abejas sin aguijón en el tratamiento de patologías oftálmicas, como lesiones en piel, de la cual, se obtuvo mejoría notable (Calderón et al.,2016).

En el Hospital de Especies Menores y Silvestres de la Universidad Nacional, se han tratado pacientes con otitis, úlceras por decúbito, conjuntivitis bacteriana y úlceras corneales mediante la aplicación de estas mieles directamente en las lesiones, observando mejoría a los pocos días de iniciado el tratamiento.

Es debido a las actividades antimicrobianas, capacidades antioxidantes y efectos antibiofilms que presentan la miel de abejas sin aguijón, que son sujeto de estudio para la formulación de nuevos productos, específicamente de uso veterinario, en la lucha contra la resistencia antibacteriana.

1.2 Objetivo General

Determinar el potencial antimicrobiano, antioxidante y antibiofilm de las mieles de *Tetragonisca angustula* y *Scaptotrigona pectoralis* para la formulación de un fármaco de uso veterinario.

1.3 Objetivos específicos

- Medir parámetros fisicoquímicos y microbiológicos de muestras de miel de *Tetragonisca angustula* y *Scaptotrigona pectoralis* para conocer la calidad de la miel.
- Cuantificar la capacidad antioxidante de las muestras de miel de *Scaptotrigona pectoralis* y *Tetragonisca angustula* mediante la prueba ORAC para determinar el grado de protección antioxidante.
- Medir los efectos antibiofilms de la miel de *Scaptotrigona pectoralis* y *Tetragonisca angustula* para valorar su acción como fármacos contra la resistencia bacteriana.

2. MARCO TEÓRICO

En investigaciones previas se evaluó la carga microbiológica presente en 30 muestras de miel de abejas sin aguijón. Los resultados indicaron que el 87% de las muestras tenía recuentos bacterianos y de esporas iguales o menores a 1.0×10^1 UFC/g, ausencia de coliformes fecales y de *Clostridium botulinum* (Zamora et al., 2011).

En el año 2014, Zamora y colaboradores reportaron el análisis de 65 muestras de mieles de meliponinos, las cuales presentaron ausencia de coliformes totales, recuentos bacterianos bajos ($<1.0 \times 10^1$ UFC/gramo; EST de miel).

Se analizó por medio del ensayo de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR siglas en inglés), la presencia de *Clostridium botulinum*, tipo A, B, E y F, serotipos responsables de ocasionar el botulismo en el ser humano. De las 65 muestras analizadas, ninguna presentó resultados positivos a la presencia de esporas. (Zamora et al., 2014.)

La miel de meliponinos presenta actividad contra agentes bacterianos involucrados en retardar el proceso de cicatrización en pacientes con quemaduras y heridas, como *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* (Zamora et al., 2014).

Estas mieles, exhiben propiedades inhibitorias sobre cepas de *S.aureus* y *P. aeruginosa* resistentes a antibióticos; así fue reportado por Zamora et al (2015^b), al analizar 57 muestras de miel de meliponinos, donde el 44% de las mieles fueron capaces de inhibir todas las cepas resistentes a los antibióticos.

La actividad antimicrobiana presente en la miel de abejas sin aguijón es comparable con el apósito de miel de Manuka conocido comercialmente como Medihoney®. El apósito Medihoney® es considerado la única terapia antioxidante específicamente aprobado por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos para cicatrización de heridas (Zamora et al., 2015^a).

En el año 2015, se realizó la primera comparación de la miel de abejas sin aguijón y Medihoney® en sus capacidades antioxidantes y actividades inmunomoduladoras. La cual concluyó que las mieles analizadas demostraron capacidades no estadísticamente diferentes de Medihoney®. (Zamora et al., 2015^a).

El estudio atribuyó a la eliminación de radicales de oxígeno y a la inhibición de la enzima xantina oxidasa la capacidad de las mieles de meliponinos de disminuir el proceso inflamatorio y de promover el equilibrio en los procesos de oxidación y reducción (Zamora et al, 2015^a). El desbalance en estos procesos deriva en estrés oxidativo, daño celular por los efectos de la oxidación y consecuente aparición de enfermedades. (Del Arenal et al., 2020).

En el 2017, Zamora y colaboradores encontraron en la miel de *Tetragonisca angustula* dos moléculas capaces de interrumpir la integridad de la matriz de los biofilms (factores de destrucción de biofilms de *Tetragonisca angustula*: (TABDF-1 y TABDF-2.), dejando expuestas las bacterias persistentes a la acción de los antibióticos; a los cuales, previamente se presentó resistencia. Este hallazgo es muy valioso, ya que no existen medicamentos para el tratamiento concreto de los biofilms (Rabin et al., 2015).

Las investigaciones anteriormente mencionadas reportan en las mieles de meliponinos una baja carga microbiológica, ausencia de *C. botulinum*, actividad antimicrobiana de amplio espectro y potencial antioxidante permiten valorar su utilización en el tratamiento de lesiones y quemaduras (Zamora et al., 2014).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Revisión bibliográfica actualizada sobre las características antibacterianas y antibiofilms de las mieles de meliponinos.

3.1 Colecta de muestras

Las muestras de miel sujetas a análisis fueron de las especies *Scaptotrigona pectoralis* y *Tetragonisca angustula*, procedentes de la provincia de Puntarenas, San Vito, Coto Brus. Las muestras fueron adquiridas a través de la empresa Miel Dorada de la Bajura de Santa Cruz S.A.

Se empleo como referencia en los análisis, 30 gramos del medicamento Veterinario Kruuse Manuka G°. El cual, es un apósito estéril para heridas; cuyo principio activo es 100% miel procedente del arbusto *Leptospermum scoparium* (Manuka) de Nueva Zelanda.

Las muestras fueron almacenadas y analizadas en el Laboratorio de Microbiología y Química Medicinal del Centro de Investigaciones Apícolas Tropicales (CINAT) de la Universidad Nacional.

3.2 Formulaciones

Se crearon 11 formulaciones cuyos principios activos son mieles de *Scaptotrigona pectoralis* y/o *Tetragonisca angustula*. Su composición es confidencial.

3.3 Carga Microbiana

Se realizaron las pruebas de Recuento total aerobio, recuento total hongos y levaduras, Número más probable (NMP) de coliformes totales y coliformes fecales con *E. coli* como indicador y determinación de *Salmonella sp.* acorde a los métodos descritos por (Zamora et al., 2014).

3.4 Parámetros Físicoquímicos

Las pruebas de humedad y densidad se realizaron según el protocolo descrito en los Métodos Armonizados de la Comisión Internacional de la Miel (Bogdanov, 2009).

3.5 Actividad Antimicrobiana

La evaluación de la actividad antimicrobiana de las muestras se realizó mediante ensayos de concentración mínima inhibitoria (MIC) contra cepas ATCC (American Type Culture Collection) de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Candida albicans* (ATCC 10231) *Staphylococcus aureus* (SA0074), acorde al método descrito por Zamora et al (2014).

3.6 Capacidad Antioxidante

La determinación del valor ORAC y el contenido fenólico total mediante el reactivo de Folin-Ciocalteu se realizó a partir de los procedimientos descritos por Zamora et al (2015^a)

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las densidades de las muestras de miel de *Tetragonisca angustula* y *Scaptotrigona pectoralis* presentaron valores muy similares. La determinación de densidad permite la elaboración de soluciones comparables en concentración (Zamora et al., 2014). Lo anterior, nos permitió crear junto con otros agentes, formulaciones que sean comparables. Según Zamora et al (2014), la miel de *Tetragonisca angustula* presenta una humedad de 19.8 a 24.8 y la de *Scaptotrigona pectoralis* de 24.2 a 26.0. Los resultados de humedad obtenidos para las muestras analizadas fueron similares. (Ver tabla1).

Tabla 1. Densidad y Humedad de las mieles de *Tetragonisca angustula* y *Scaptotrigona pectoralis*.

Especie	Densidad(g/ml) +/- 0.001	Humedad (%) +/- 0.2
<i>Tetragonisca angustula</i>	1.376	24.7
<i>Scaptotrigona pectoralis</i>	1.371	25.7

A partir de las mieles de *Tetragonisca angustula* y *Scaptotrigona pectoralis* se realizaron formulaciones donde dichas mieles son los principios activos. A fin de evaluar los posibles riesgos de fermentación de las formulaciones iniciales, se realizaron ensayos de cargas microbiológicas (Ver Tabla 2).

Tabla 2. Recuentos microbianos para formulaciones.

Código de formulaciones	Recuento Total Aerobio RTA (UFC/g)	Recuento Total Hongos y Levaduras RTHyL (UFC/g)	NMP Coliformes totales y fecales <i>E. coli</i> como indicador	Determinación de <i>Salmonella sp.</i>
A	$1,5 \times 10^2$	$7,0 \times 10^2$	<3NPM/g;EST (Ausencia)	Ausencia en 25g
B	$9,5 \times 10^1$	$9,0 \times 10^2$	<3NPM/g;EST (Ausencia)	Ausencia en 25g
C	$1,4 \times 10^2$	$5,5 \times 10^2$	<3NPM/g;EST (Ausencia)	Ausencia en 25g
D	$1,5 \times 10^1$	$1,5 \times 10^2$	<3NPM/g;EST (Ausencia)	Ausencia en 25g
E	$6,0 \times 10^1$	$7,0 \times 10^2$	<3NPM/g;EST (Ausencia)	Ausencia en 25g

F	$1,9 \times 10^2$	$1,5 \times 10^3$	<3NPM/g;EST (Ausencia)	Ausencia en 25g
G	$1,1 \times 10^2$	$9,5 \times 10^2$	<3NPM/g;EST (Ausencia)	Ausencia en 25g
H	$1,5 \times 10^2$	$1,3 \times 10^2$	<3NPM/g;EST (Ausencia)	Ausencia en 25g
I	$1,1 \times 10^2$	$6,5 \times 10^2$	<3NPM/g;EST (Ausencia)	Ausencia en 25g
J	$8,0 \times 10^1$	$1,5 \times 10^2$	<3NPM/g;EST (Ausencia)	Ausencia en 25g
K	$1,5 \times 10^1$	5×10^1	<3NPM/g;EST (Ausencia)	Ausencia en 25g
KrusseManuka G®	Formulación Estéril			
Medihoney®	Formulación Estéril			

UFC/g: unidades formadoras de colonia por gramo, NMP: número más probable.

Acorde a la Farmacopea Europea, las sustancias no estériles a emplearse con fines farmacéuticos deben estar libres de patógenos, reportar recuentos totales aerobios menores a 10^3 UFC/g y recuentos totales de hongos y levaduras menores a 10^2 UFC/g (European Directorate for the Quality of Medicines and Health care, 2011). Las formulaciones presentaron recuentos microbiológicos favorables y en todas se evidenció la ausencia de coliformes totales y fecales, así como de *Salmonella sp.* Si bien la miel no es un medio estéril, se buscan mieles con cargas microbianas bajas, ya que, al realizar las formulaciones, las cargas microbianas de los demás constituyentes se suman en el producto final.

Es importante garantizar la ausencia en la miel de esporas de *C. botulinum*, ya que se considera un factor limitante para su uso en heridas (Zamora et al., 2014) por el riesgo de ingreso al organismo a través de la lesión y la consecuente liberación de la toxina botulínica.

Las esporas de *C. botulinum* germinan en ausencia de oxígeno, son termorresistente, crecen y excretan neurotoxinas termolábiles (destrucción a 85 grados centígrados), los casos de botulismo por transmisión alimentaria guardan relación con alimentos listos para consumo y empacados a bajos niveles de oxígeno (Casado, 2018). La ausencia de *C. botulinum* en la miel de meliponinos (Zamora et al., 2011; Zamora (2014)) le permite su empleo en la elaboración de productos para el tratamiento de heridas y quemaduras.

Zamora, (2014) plantea la hipótesis de que la ausencia de esporas de *C. botulinum* se debe a la alta biodiversidad de Costa Rica. Esto crea un ambiente microbiano competitivo que no ofrecen las condiciones para el desarrollo de las esporas anaeróbicas en la miel. A pesar, de los reportes favorables anteriores, es necesaria la evaluación por PCR de la presencia de *C. botulinum*, debido al uso que se le intenta dar a las presentes fórmulas.

Para el presente estudio, se comparó la actividad inhibitoria de las fórmulas antes mencionadas con la miel de Kruuse Manuka G[®] de uso veterinario, así como con el medicamento de uso humano Medihoney[®]. La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) se refiere a la concentración más baja de un antimicrobiano capaz de inhibir el crecimiento de un determinado microorganismo (Ver tabla 3).

Tabla 3. Concentración Mínima Inhibitoria (CMI, mg/ml) de las formulaciones y los medicamentos Kruuse Manuka G[™] y Medihoney[®] contra cepas ATCC de microorganismos relevantes en infecciones de quemaduras y heridas.

Código de Formulaciones	Concentración Mínima Inhibitoria (mg/ml)				
	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>C. albicans</i>
A	125	125	250	125	NI
B	62,5	125	250	62,5	NI
C	125	125	250	125	NI
D	62,5	62,5	250	62,5	NI
E	62,5	62,5	250	62,5	NI
F	125	250	250	250	NI
G	62,5	125	250	250	NI
H	62,5	125	250	250	NI

I	62,5	125	250	125	NI
J	31,3	62,5	250	62,5	NI
K	62,5	62,5	125	62,5	NI
Porcentaje de formulaciones mejores que los medicamentos	73	91	0	73	0
KrusseManuka G®	125	250	250	250	NI
Medihoney®	125	250	125	250	NI

NI: no se reporta inhibición bajos las condiciones de ensayo.

Los resultados nos permiten indicar que el efecto antimicrobiano de las formulaciones es de amplio espectro, y además es igual ó superior al medicamento de uso veterinario Kruse Manuka G® y el fármaco Medihoney®.

Actualmente, las infecciones causadas por cepas de *Staphylococcus sp.* productoras de biofilms tienen elevada importancia clínica; ya que provocan períodos de tratamiento más prolongados con consecuente deterioro del paciente (Zamora et al., 2017). Esto se debe a la protección que les brinda la matriz extracelular (biofilm), ya que protege a las bacterias de los mecanismos de defensa inmunológica del huésped, así como de los agentes antimicrobianos de rutina. Es por ello, que en este estudio evaluamos los efectos de las formulaciones y los fármacos Kruse Manuka G® y Medihoney® sobre la cepa de *Staphylococcus aureus* (SA0074) productora de biofilms. (ver tabla 4.)

Tabla 4. Efectos de las formulaciones sobre una cepa de *S. aureus* formadora de biofilms

Código de formulaciones	Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) (mg/mL)	Efectos sobre Biofilm.	
		Inhibición de la formación de biofilm. Concentración Inhibitoria Media (IC50) (mg/mL)	Destrucción del biofilm. Concentración Inhibitoria Media (IC50) (mg/mL)
A	125	11,85	6
B	62,5	16,6	5,3
C	62,5	14	4,8
D	62,5	22,75	5,5
E	125	21,3	13,3
F	125	9,5	4,5
G	125	11,25	5,9
H	125	14,55	4
I	250	22,05	8,7
J	125	21,2	10,3
K	62,5	29,3	8,4
KruuseManukaG®	125	34,75	NO IC50
Medihoney®	250	55	NO IC50

NO IC50: No se reporta efecto anti-biofilm bajo condiciones de ensayo.

Los biofilms constituyen un obstáculo importante para la cicatrización de heridas debido al mecanismo de sobrevivencia que exhiben. Este consiste en dos subpoblaciones bacterianas: bacterias planctónicas o células libres que son sensibles a los mecanismos inmunitarios del huésped, así como a los antisépticos y antibióticos, y células sésiles que se encuentran incrustadas en una sustancia polimérica extracelular, aisladas y protegidas de la acción de defensa del sistema inmunológico y la acción de fármacos antibacterianos (Zamora et al.,2017).

Aunque la inmunidad innata del huésped reconoce y reacciona contra la sustancia polimérica extracelular del biofilm; los polimorfonucleares y leucocitos son incapaces de eliminar el biofilm y las especies reactivas de oxígeno que se liberan en el medio intracelular, dañan el tejido y perpetúan el proceso inflamatorio, lo que hace que los biofilms se comporten como reservorios de infección (Zamora et al, 2017).

La capacidad de inhibición de la formación de biofilm de *S. aureus* y la destrucción de un biofilm de *S. aureus* previamente establecido, demuestran que las formulaciones corroboran los hallazgos descritos por Zamora et al (2017); donde se indica el potencial de la miel de meliponinos para la investigación y el desarrollo de nuevos productos para combatir la resistencia antibacteriana.

Los resultados de nuestros análisis permiten demostrar la acción antibiofilm de las formulaciones; al presentar capacidad de inhibir la formación de biofilms a menor dosis que los fármacos Kruuse ManukaG® y Medihoney®.

La capacidad de destrucción de biofilms es una propiedad intrínseca de la miel de *Tetragonisca angustula*; la presencia de dos moléculas proteicas: factores de destrucción de biopelículas de *Tetragonisca angustula*: TABDF-1 y TABDF-2 son capaces de interrumpir la integridad de la matriz del biofilms, ocasionando la destrucción del mismo. (Zamora et al, 2017). Este es un hallazgo sin precedentes, debido a que en promedio el 80% de las infecciones bacterianas involucran biofilms (Zamora et al., 2017).

La resistencia antimicrobiana en el ambiente clínico se debe a la presencia de bacterias formadoras de biofilms (Zamora et al., 2017). La capacidad de inhibición y destrucción del biofilms que presentan nuestras formulaciones, permite considerarlas como potenciales innovaciones a aplicar en la lucha contra la resistencia bacteriana.

Adicional a la contaminación bacteriana en una herida, otro obstáculo que enfrenta la curación es el proceso inflamatorio (Senet, 2008), el cual puede retardar y dificultar la cicatrización.

En la cicatrización de heridas media una fase inflamatoria, donde los polimorfonucleares fluyen a la herida para fagocitar y destruir agentes nocivos, por ello son considerados la primera línea de defensa celular innata (Zamora et al., 2015^a).

Los microorganismos fagocitados y opsonizados quedarán envueltos en vacuolas, donde el proceso oxidativo genera especies radicales de oxígeno (ERO) que destruirán a los microorganismos, para finalmente, ser digeridos por enzimas proteolíticas (Zamora et al, 2015^a). Desequilibrios en este proceso, generan liberación excesiva de especies radicales de oxígeno que lesionan macromoléculas como son proteínas y material genético (Acido Desoxirribonucleico: ADN), lo que ocasiona el proceso llamado estrés oxidativo, el cual, genera más radicales libres como especies reactivas de nitrógeno y se activarán más células inflamatorias que perpetúan la inflamación y por lo tanto, el retraso en la cicatrización de una lesión. Se buscan sustancias biológicas que contrarresten el estrés oxidativo, al restaurar la homeostasis redox y atrapar los radicales libres de oxígeno y, en consecuencia, mejorar la cicatrización de herida (Zamora et al., 2015^a).

Mediante el análisis de valor ORAC de las fórmulas, pudimos evaluar su capacidad de atrapar los radicales libres de oxígeno, lo cual permite determinar la capacidad antioxidante in vitro. Entre más elevado sea el valor del ORAC, mayor es la capacidad antioxidante de la formulación. La presencia de compuestos fenólicos en la miel está relacionada con su capacidad reductora y antioxidante, por lo que medimos contenido de fenólicos totales de las once formulaciones y los fármacos de uso veterinario Krusse Manuka G[®] y Medihoney[®] de uso humano (ver tabla 5).

Tabla 5. Capacidad antioxidante de las fórmulas en estudio: Contenido fenólico total y valor ORAC.

Código de Formulaciones	Contenido Fenólicos Total (µg GAE/mg)	SD	Valor ORAC (µmol TE/100g)	SD
A	0,79	0,05	433	76
B	0,59	0,08	357	33

C	0,59	0,05	427	76
D	0,59	0,05	323	69
E	0,63	0,07	296	81
F	0,6	0,06	487	88
G	0,73	0,16	471	83
H	0,68	0,05	457	79
I	0,66	0,07	415	71
J	0,57	0,03	400	55
K	0,56	0,08	316	67
KruuseManuka G®	2,28	0,13	1249	102
Medihoney®	1,56	0	970	0

Los resultados de nuestro análisis reportan similitud en las capacidades antioxidantes de las fórmulas estudiadas. Lo anterior, debido a que todos los resultados de valor ORAC y de contenido fenólico total se encuentran en el mismo ámbito. Este resultado demuestra que es posible la estandarización de la capacidad antioxidante de fórmulas que emplean mieles como principio activo.

De las once formulaciones se eligieron dos candidatos, las cuales, cumplían con criterios de idoneidad. Las fórmulas debían cumplir con los siguientes parámetros:

- a) Baja carga microbiológica.
- b) Potente efecto antimicrobiano y de amplio espectro.
- c) Efecto antimicrobiano contra una cepa productora de biofilms, así como efecto inhibitorio sobre la formación de biofilms y la capacidad de destrucción de biofilms previamente formados.

Según los anteriores criterios, se seleccionaron las fórmulas B y C. (Ver tabla 6).

Tabla 6. Parámetros de selección de los candidatos B y C, para el desarrollo de un producto de uso veterinaria en la curación de quemaduras y heridas.

								BIOFILMS	BIOFILMS	BIOFILMS
			MIC	MIC	MIC	MIC	MIC	MIC	IC50	IC50
Formulación	RTA	RTHyL	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. enteritidis</i>	<i>C. albicans</i>	SA0074	BF	BD
B	9,5x10 ¹	9,0x10 ²	62,5	125	250	62,5	NI	62,5	16,6	5,3
C	1,4x10 ²	5,5x10 ²	125	125	250	125	NI	62,5	14	4,8

MIC: Mínima Concentración Inhibitoria, RTA: Recuento total aeróbico, RTHyL: Recuento total Hongos y Levaduras, SA0074: cepa ATCC (American Type Culture Collection) de *Staphylococcus aureus* 0074, IC50: Concentración inhibitoria Media, BF: Inhibición de la formación de biofilms, BD: Destrucción del biofilms.

Las formulaciones B y C presentaron un recuento microbiológico óptimo según los criterios de la Farmacopea Europea. Además, reportan ausencia de microorganismos patógenos como *E. coli* y *Salmonella sp.* Los siguientes criterios de selección fueron el espectro antimicrobiano y sus efectos antibiofilm. Ambos criterios se evaluaron a la vez. Este proceso llevo a los candidatos óptimos según el presente estudio.

5. CONCLUSIONES

- Las fórmulas analizadas demuestran ser candidatas muy valiosas en la formulación de nuevos productos de uso veterinario en la lucha contra la resistencia antibacteriana.
- Un amplio espectro de acción antimicrobiano y una baja carga microbiológica son fundamentales en agentes tópicos cuya finalidad sea el favorecer el proceso de curación de una herida.
- Las formulaciones presentaron recuentos microbiológicos favorables y en todas se evidenció la ausencia de coliformes totales y fecales, así como de *Salmonella sp.*
- En los diferentes análisis se comparó las propiedades de Medihoney® y Krusse Manuka G® con las formulaciones. En espectro antibacteriano y actividad contra biofilms las fórmulas superaron a los fármacos mencionados.
- La base de estos nuevos desarrollos es brindar opciones de agentes tópicos que combatan la resistencia antibacteriana. Las formulaciones demuestran la capacidad de inhibir el crecimiento y destrucción de los biofilms.
- En fórmulas que utilizan miel como principio activo, es posible la estandarización de la capacidad antioxidante.
- Las fórmulas denominadas en este estudio B y C, demostraron idoneidad para ser consideradas potenciales fármacos de uso veterinario en la lucha contra la resistencia antibacteriana; al tener un amplio espectro antibacteriano de acción y presentar una menor dosis efecto para inhibición del crecimiento y destrucción de la membrana del biofilms.

6. RECOMENDACIONES

- Garantizar la ausencia de esporas de *Clostridium botulinum* mediante la irradiación por rayos gamma., lo cual, permitirá la esterilidad del medicamento y alargar su vida en anaquel.

- Realizar pruebas de Mínima Concentración Inhibitoria (MIC) contra cepas antibiótico-resistentes de nivel comunitario en especies domésticas.

- Previo al registro de un medicamento, se debe registrar el laboratorio fabricante o droguería en la dirección de medicamentos del Servio de Salud Animal (SENASA). El laboratorio debe contar con el certificado de Buenas Prácticas de Manufactura de Medicamentos Veterinarios, según Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA) 65.05.51:08 para medicamentos veterinarios y productos afines.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Araújo, A. (2019). Formación de biofilms por bacterias. (Trabajo Fin de Grado Inédito). Universidad de Sevilla, Sevilla. <https://hdl.handle.net/11441/88065>.
- Bogdanov, S. (2009). Harmonized methods of the International Honey Commission. Disponible en: <http://www.ihc-platform.net/ihcmethods2009.pdf>.
- Calderón, Rafael., Herrera, E y Ramírez, M. (2016). Experiencias sobre el uso de la miel de abejas nativas sin aguijón para el tratamiento de heridas y problemas oculares en animales domésticos. *Notas Apícolas* N16.52-54p.
- Cauich, R., Ruiz, J., Ortíz y Segura, M. (2015). Potencial antioxidante de la miel de *Melipona beecheii* y su relación con la salud: una revisión. *Nutrición Hospitalaria*, 32(4), 1432-1442. <https://dx.doi.org/10.3305/nh.2015.32.4.9312>.
- Carvajal, C. (2019). Especies reactivas del oxígeno: formación, función y estrés oxidativo. *Medicina Legal de Costa Rica*, 36(1), 91-100. Retrieved July 08, 2021, from http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1409-00152019000100091&lng=en&tlng=es
- Casado, M. (2018). Toxinas bacterianas: Uso de la toxina botulínica en la neuralgia post hepática. (Trabajo final de grado) Universidad Complutense, Argentina.
- Costerton, J. W., Stewart, P y Greenberg, E. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284 (5418): 1318-1322.
- Da Silva J, Espinal, M y Ramón, P. (2020) Resistencia a los antimicrobianos: tiempo para la acción. *Rev Panam Salud Pública*. 2020;44. e122 <https://doi.org/10.26633/RPSP.122>.
- Del Arenal, I., Guevara, A y Martínez, J. (2020), Homeostasis redox, Memoria del 47º Taller de Actualización Bioquímica, Facultad de Medicina; UNAM. <http://bq.facmed.unam.mx/tab>
- Dente KM. Alternative treatments for wounds: leeches, maggots, and bees. *Medscape Today/Medscape General Surgery*. Recuperado de 76 <http://www.medscape.com/viewarticle/563656>.
- Do Vale, M., Augusto, F., dos Santos, B y Batista, J. (2018). Honey quality of *Melipona sp.* bees in Acre, Brazil. *Acta Agronómica*, 67(2), 201–207. <https://doi.org/10.15446/acag.v67n2.60836>
- European Directorate for the Quality of Medicines and Healthcare. 2011. *European Pharmacopoeia*, 7th Edition. Council of Europe. Strasbourg, France.

- FAO, Informe para el secretario general de las Naciones Unidas, abril, (2019). Recupera de https://www.who.int/antimicrobial-resistance/interagency-coordination-group/IACG_final_report_ES.pdf.
- Federal Drug Administration. (2008). Summary for DermaSciences OTC APIMED, Medihoney Primary and Medihoney 100% Honey Dressings with Active Manuka Honey. Available at: http://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/pdf8/k081584.pdf.
- Lavandera, I. (2011). Curación de heridas sépticas con miel de abejas. *Revista Cubana de Cirugía*, 50(2), 187-196. Recuperado en 24 de noviembre de 2020, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-&lng=es&tlng=es.
- Nates-Parra, G. Las Abejas sin Aguijón (Hymenoptera: Apidae: Meliponini) de Colombia. *Biota Colombiana* 2001; 1:1-9.
- Rabin, N., Zheng, Y., Opoku-Temeng, C., Du, Y., Bonsu, E., y Sintim, H. O. (2015). Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. *Future Medicinal Chemistry*, 7(4), 493–512. doi:10.4155/fmc.15.6.
- Senet, P. (2008). Fisiología de la cicatrización cutánea. *EMC - Dermatología*, 42(1), 1–10. doi:10.1016/s1761-2896(08)70356-x.
- Singleton, V., Orthofer, R y Lamuela-Raventós, R. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods in Enzymology*.
- Ulloa, J., Mondragon, P., Rodriguez, R., Resendiz, J y Rosas., U. (2010) La miel de abeja y su importancia, *Revista Fuente Año 2, No. 4*. Recuperado de <http://fuente.uan.edu.mx/publicaciones/01-04/2.pdf>.
- Van Veen, J., Ramírez, J., Sánchez L., Aguilar Ingrid., Herrera, E., Umaña, E., Fallas, N., Calderón, R., Ramírez, M. y Hernández, P. (2019). *Manual de abejas*. CINAT.
- Vit, P., Medina, M. y Eunice, M. (2004). Quality standards for medicinal uses of Meliponinae honey in Guatemala, Mexico and Venezuela. *BeeWorld*, 85 (1), 2–5. doi: 10.1080/0005772X.2004.11099603.
- Vit P, E., Barth O., Matsuda A. y Almeida-Muradian, L. (2006) Necesidad del control de calidad de la miel de abejas sin aguijón. *Medula* 15: 36-424. *ijms*141020983.
- Zamora, L y Arias, M. (2011). Calidad microbiológica y actividad antimicrobiana de la miel de abejas sin aguijón. *Revista Biomedica*, 22(2), 59–66

- Zamora, L., Beukelman, C., van den Berg, A., Arias, M., Umaña, E., Aguilar I., Sánchez, L., Fallas, N., Quarles van Ufford, H. y Gross, N. (2014). The antimicrobial activity and microbiological safety of stingless bee honeys from Costa Rica. *Journal of Apicultural Research* 53 (5): 503-513.
- Zamora, L., Beukelman, C., van den Berg, A., Arias, M., Umaña, E., Aguilar, I., Quarles van Ufford, H., van den Worm, E., Fallas, N y Solórzano, R. (2015). The antioxidant capacity and immunomodulatory activity of stingless bee honeys proceeding from Costa Rica. *Oxidants and Antioxidants in Medical Science* 4 (1): 49-55.
- Zamora, L., Beukelman, C., van den Berg, A., Arias, M., Umaña, E., Aguilar, I. y Fallas, N. (2015). Stingless bee honeys from Costa Rica exhibit antimicrobial activity against antibiotic-resistant clinical isolates. *Journal of Biologically Active Products from Nature* 5 (2): 144-149.
- Zamora, L., Beukelman, C., van den Berg, A., Aerts, P., Quarles van Ufford, H., Nijland, R., Arias, M. (2017). An insight into the antibiofilm properties of Costa Rican stingless bee honeys. *Journal of Wound Care* 26 (4): 168-177.
- Zamora L. (2018) Characterization of Bioactive Constituents Costa Rican by Stingless Bees (Tesis doctoral) Faculty of Science, Utrecht University, Utrecht, The Netherlands.