



**FACULTAD DE MEDICINA HUMANA Y CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUIMICA.**

TESIS

**ACTIVIDAD ANTIBIÓTICA DE LOS GRANOS DE KÉFIR EN HERIDAS
INFECTADAS EN RATAS BLANCAS (*rattus norvegicus*).**

PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE QUÍMICO FARMACÉUTICO

BACHILLER: SALAZAR RAMOS, Giancarlos.

ASESOR: Mg. ARÉVALO ORTIZ Fermín.

LIMA – PERÚ

2016

DEDICATORIA

El presente trabajo se lo dedico a Dios por darme vida y salud para realizarlo, a mis padre, a mi hermana, a los docentes que me apoyaron en mi formación profesional.

AGRADECIMIENTOS

Primero, a Dios, por permitirme realizar el presente trabajo y por todas sus bendiciones. A mis padres, hermana y familiares por su apoyo incondicional en todos los aspectos de mi vida profesional y personal. A mi asesor de tesis, al Q.F Montellanos por ser un ejemplo de moralidad, intelectual y fortaleza.

RESUMEN

En este estudio se evaluó el efecto antibiótico de los granos de kéfir, utilizando como material biológico de análisis ratas blancas provenientes del bioterio de la Universidad Nacional Agraria la Molina, se emplearon 24 ratas, a las cuales se separaron en cuatro grupos, dos experimentales con sus respectivos grupos control. Todas las ratas fueron sometidas a cortes en la región superior del lomo izquierdo, para luego ser inoculadas con bacterias gram (+) y gram (-) respectivamente y así generarles una infección, a la cual se le dio tratamiento con los emplastos de los granos de kéfir. Los resultados obtenidos nos demostraron que los emplastos de granos de kéfir tienen actividad antibiótica sobre las heridas infectadas de las ratas en estudio, por lo tanto, determinante para la cicatrización y curación de las mismas. En base a los resultados obtenidos en este estudio, se recomienda profundizar la investigación a fin de obtener nuevos descubrimientos, que conduzcan a la aplicación de los beneficios de los granos de kéfir, para el tratamiento de heridas infectadas en seres humanos, sobre todo para pacientes diabéticos.

ABSTRACT

In this study the antibiotic affection of kefir grains were evaluated, using biological material analysis white rats from the animal house of the Universidad National Agrarian La Molina, 24 rats, which were separated into four groups were used, two experimental with their respective controls. All rats were subjected to cuts in the upper region of the left flank and then be inoculated with gram (+) and Gram (-) respectively and so generate them an infection, which will be given treatment with poultices of grains kefir. The results showed us that plasters kefir grains have antibiotic activity on infected wounds of the rat study, therefore, crucial to healing and curing the same. Based on the results obtained in this study, we recommend further research to obtain new findings, leading to the application of the benefits of kefir grains, for the treatment of infected wounds in humados beings, especially for patients Diabetics.

INDICE

CARÁTULA.....	I
DEDICATORIA.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
RESUME.....	IV
ABSTRACT.....	V
INTRODUCCIÓN.....	VIII
CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	10
1.1 Descripción de la Realidad Problemática.....	10
1.2 Formulación del Problema.....	11
1.3 Objetivos de la Investigación.....	11
1.3.1 Objetivo General.....	11
1.3.2 Objetivos Específicos.....	11
1.4 Hipótesis de la Investigación.....	12
1.4.1 Hipótesis General.....	12
1.4.2 Hipótesis Específicas.....	12
1.5 Justificación e Importancia de la Investigación.....	12
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO.....	14
2.1 Antecedentes de la Investigación.....	14
2.2 Bases Teóricas.....	16
2.2.1 El grano de kéfir.....	16
2.2.2 Microflora del grano de kéfir.....	18
2.2.3 Actividad antibiótica de los granos de kéfir.....	19
2.2.4 Bacteriocinas.....	20
2.2.5 Antagonismo Láctico.....	21
2.2.6 Resistencia bacteriana.....	21
2.2.7 Heridas infectadas en diabéticos.....	22
2.3 Definición de términos básicos.....	23

CAPÍTULO III: METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN	25
3.1 Tipo.....	25
3.2 Diseño.....	25
3.3 Población y Muestra.....	25
3.4 Metodología.....	25
3.4.1 Materiales.....	25
3.4.2 Método.....	26
3.5 Variables e Indicadores.....	27
3.5.1 Variable Independiente.....	27
3.5.2 Variable Dependiente.....	28
3.6 Técnicas e Instrumentos de Recolección de Datos.....	28
CAPÍTULO IV: PRESENTACIÓN DE RESULTADOS, ANÁLISIS Y INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.....	29
4.1 Presentación de resultados.....	29
DISCUSIÓN.....	34
CONCLUSIONES.....	36
RECOMENDACIÓN.....	37
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	38
ANEXOS.....	41

INTRODUCCIÓN

Desde la antigüedad el hombre ha tratado de aliviar sus dolencias buscando en la naturaleza los remedios que pudieran curar sus males. Con el tiempo encontró diversas fuentes que satisficieron de alguna manera estas necesidades, así encontró este tipo de recursos en las plantas, animales y minerales.

La historia nos dice que la lucha del hombre con las infecciones ha sido constante en el tiempo y el descubrimiento de la penicilina en 1929 por Alexander Fleming (1), marca un hito de importancia, al respecto, e inicia la era de los antibióticos; en 1877 Pasteur y Jouvart escribieron que la vida destruye a la vida entre las especies microscópicas, más que entre las especies superiores. (1, 2, 3)

Sin embargo la gran diversidad de antibióticos existentes y la facilidad con que se obtienen para su utilización, ha hecho que en la actualidad, no solo haya generado un uso y abuso de los mismos; sino que la resistencia bacteriana a los antibióticos cada vez sea mayor y se convierta en un problema de salud pública en el Perú y otras partes del mundo (3). De aquí, la necesidad de explorar nuevas formas de acción antibiótica se hace imperiosa y, una manera de realizarlo, es considerando el antagonismo láctico bien marcado en los Granos de Kéfir. (4, 5, 6, 7)

En la actualidad se sabe que muchos problemas de salud están relacionados a heridas de diversos tipos que se dan en las personas, más aun cuando éstas se infectan y se hace difícil su cicatrización, cierre y curación definitiva. Se sabe también que estos problemas son más frecuentes en personas que padecen de enfermedades silenciosas como por ejemplo la diabetes mellitus (8, 9), por lo que encontrar un modo de desinfectar las heridas para su pronta curación es una necesidad, sobre todo si la actividad antibiótica se ejerce de manera local, evitando la sistémica que,

como se sabe, hay mayor probabilidad de generar reacciones adversas al medicamento (RAM) por parte de los pacientes (1, 3). Así pues, de acuerdo a lo mencionado, utilizar emplastos de Granos de Kéfir para este propósito es lo que se estudia en este trabajo de investigación.

CAPÍTULO I

.PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1 Descripción de la Realidad Problemática.

Entre las enfermedades silenciosas y metabólicas que son recurrentes en la actualidad, la diabetes mellitus ocupa un lugar preeminente en las estadísticas de hoy, “casi el 10% de la población mundial adulta padece diabetes, determinada por una alta concentración de glucosa en sangre en ayunas (mayor o igual a 126 mg/dl). La diabetes aumenta el riesgo de padecer cardiopatías y accidentes cerebrovasculares, y multiplica por 10 las probabilidades de que haya que amputar una extremidad inferior. Es una de las principales causas de insuficiencia renal, deficiencia visual y ceguera. La mayor prevalencia de diabetes se da en la región del mediterráneo oriental y la región de las américas (el 11% en ambos sexos), y la menor, en la región del pacífico occidental y la región de Europa (el 9% en ambos sexos)”. (10)

Esta es una enfermedad que entre otras cosas trae consigo heridas que son muy difíciles de cicatrizar y que por lo mismo casi siempre van acompañadas de infecciones que obliga al paciente a consumir antibióticos, que si bien es cierto, por una parte controla la infección, por otra parte genera en el paciente muchos problemas relacionados al uso de antibióticos por tiempo prolongado y también las relacionadas a las reacciones adversas al medicamento (RAM). (1, 3)

“El uso frecuente de antibióticos en los pacientes con pie diabético hace que las resistencias antimicrobianas sean uno de los factores a tener en cuenta a la hora de elegir un antibiótico, especialmente para evitar un tratamiento empírico inadecuado. La utilización racional de los fármacos puede mejorar los resultados de las infecciones de los pies diabéticos.” (4)

Encontrar un método alternativo en la cura de las heridas de estos pacientes sin que el antibiótico sea utilizado sistémicamente, reviste importancia para la salud de cualquier diabético. Es aquí donde este trabajo de investigación se hace presente utilizando los Granos de Kéfir como agente antibacteriano local, dada las diferentes bacteriocinas que son capaces de producir debido a las bacterias lácticas de su microbiota y al antagonismo láctico que es inherente a estas. (7, 11)

Esta investigación no es posible realizarla en humanos directamente, por eso que en el presente trabajo se utilizarán ratas blancas "*Rattus norvegicus*" para hacer el estudio.

1.2 Formulación del Problema.

¿El uso de emplastos de granos de kéfir, tendrá efecto antibiótico sobre las heridas infectadas en ratas blancas "*Rattus norvegicus*"?

1.3 Objetivos de la Investigación.

1.3.1 Objetivo General

Determinar la actividad antibiótica de los granos de kéfir, en heridas infectadas en ratas blancas.

1.3.2 Objetivo Específicos

- Cuantificar y evaluar estadísticamente la mortalidad de las ratas en estudio.
- Evaluar la infección, subsecuente inflamación, proceso de cicatrización y crecimiento de pelaje, en las heridas de las ratas en estudio, en el tiempo.
- Preparar los emplastos de kéfir para evaluar su efecto bactericida y cicatrizante en las heridas infectadas en las ratas en estudio.

1.4 Hipótesis de la investigación.

1.4.1 Hipótesis general

Los granos de kéfir debido a las bacteriocinas que producen, es probable que sean capaces de curar heridas infectadas en ratas blancas.

1.4.2 Hipótesis Específicas

- Es probable que la infección provocada en las ratas sea causal de mortalidad.
- La infección y la inflamación inherente a las heridas de las ratas en estudio, probablemente genere distorsión en el crecimiento del pelaje circundante a las heridas.
- A medida que pasen los días, es posible que se observe una franca mejoría de las heridas infectadas de las ratas merced al efecto bactericida y cicatrizante de los emplastos de los granos de kéfir.

1.5 Justificación e importancia de la investigación.

En la actualidad según un último informe de la OMS (Organización Mundial de la Salud), el uso irracional de antibióticos se ha vuelto una amenaza mundial (3) lo cual está generando que una amplia gama de bacterias, tanto gram positivas como gram negativas, que normalmente eran sensibles a estos medicamentos, generen un mecanismo de resistencia que dificulta y pone en riesgo el éxito frente a un tratamiento antibiótico. Siempre ha habido resistencia bacteriana hacia los antibióticos; pero en la actualidad existen bacterias para las cuales ya no hay tratamiento y esto ocurre en todos los países del mundo, siendo indistinto a una determinada etapa etaria, sexo, cultura, sociedad, etc. (2, 3). Como ya se ha mencionado, en los diabéticos, las probabilidades de que haya que amputar una extremidad inferior como resultado final a una

infección en la cual la terapia antibiótica no tuvo éxito, es multiplicada por 10 respecto a una persona que no padece de dicha enfermedad (10) por lo que en esta investigación se busca dar una nueva alternativa a estos pacientes, ya que según investigaciones se ha corroborado que los Granos de Kéfir, debido a su amplia flora bacteriana, tendría actividad antibiótica merced a la producción de bacteriocinas gracias a un mecanismo conocido como antagonismo láctico(5, 6, 7, 11, 12) ,que usado en forma tópica podría generar la mejora de las misma, facilitando su cicatrización.

CAPITULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes de la investigación

En Perú existen solo dos estudios realizados en granos de kéfir, pero ninguno está destinado a demostrar sus aplicaciones medicinales de este producto. Los estudios que actualmente se encuentran son investigaciones realizadas en otros ámbitos ya sea al campo alimentario, zootecnista y biotecnológico; dentro de ellos cabe mencionar:

- En la siguiente investigación, realizada por Mg. Arévalo ORTIZ Fermín (2005) **“ESTUDIO DE LA VELOCIDAD DE AGITACIÓN EN LA OBTENCIÓN DE LA BIOMASA DE LA MICROBIOTA DE LOS GRANOS DE KÉFIR UTILIZANDO SUERO DE LECHE Y MELAZA DE CAÑA**, hace referencia que esta mezcla de microorganismo requiere agitación para optimizar su crecimiento y que puede crecer en un amplio rango de velocidades. (21)
- En la siguiente investigación, realizada por Sasaki, T. D. (1995) **“PROCESOS DE ELABORACIÓN DE KÉFIR”**, se concluye que los granos de kéfir deben ser rejuvenecidos para la elaboración del producto, el producto de mayor aceptación fue elaborado con leche 3% de grasa, incubado a 25°C hasta una acidez final de 86°D y madurado a 25°C, hasta una temperatura final de 110°D y que el kéfir elaborado tuvo una vida en almacenamiento de 6 días a una temperatura de 8°C. (4)
- En la siguiente investigación, realizada por María del socorro ramirez (2005) **“ACTIVIDAD INHIBITORIA DE CEPAS DE**

BACTERIA ÁCIDO LÁCTICAS FRENTE A BACTERIAS PATÓGENAS Y DETERIORADORAS DE ALIMENTOS”, se

concluyó que de las 293 cepas de BAL en estudio, el 24.57% mostraron actividad antibacteriana contra al menos uno de los microorganismos patógenos y/o deterioradores de prueba, de las cepas de BAL en estudio solo se obtuvo inhibición en contra de bacterias Gram negativas, por consiguiente se recomienda continuar con la purificación de los compuestos antimicrobianos involucrados en la actividad inhibitoria, con el fin de lograr su utilización en diversos alimentos. (5)

- En la siguiente investigación, realizada por Ana Guadalupe (2012) **“ESTANDARIZACIÓN DEL PROCESO DE FERMENTACIÓN DE LECHE ENTERA ULTRAPASTEURIZADA CON GRANULOS DE KÉFIR”**, se concluye que la producción de biomas de los gránulos de kéfir, según el análisis de varianza realizado el aumento de biomasa medio a 25°C es mayor que a 30°C y 35°C, estableciéndose las condiciones óptimas de fermentación a 25°C. también se ha demostrado que existe diferencia significativa entre las medidas de pH en los 3 niveles de temperatura de fermentación correspondiente a 25°C, 30°C y 35°C, y que por consiguiente el tiempo de fermentación, depende de la temperatura, por ende se produce un descenso en el pH de la leche entera ultrapasteurizada durante el proceso de fermentación. (13)
- En la siguiente investigación, realizada por Alejandra Londero A. (2012) **“OBTENCIÓN DE UN PRODUCTO PROBIOTICO PARA AVES A PARTIR DE SUERO DE QUESERÍA FERMENTADO CON MICROORGANISMOS DE KÉFIR”** se concluye que los gránulos de kéfir cultivados en suero y el suero fermentado con los mismos contienen

microorganismos pertenecientes a las especies: *Lactobacillus kéfir*, *Lactobacillus kefiranofaciens*, *Lactobacillus parakefir*, *Lactococcus lactis*, *Kluyveromyces marxianus* y *Saccharomyces cerevisiae*. Cuando los gránulos son inoculados en suero en concentración 1 % p/v el producto fermentado obtenido presenta similar concentración de levaduras y mayor concentración de bacterias ácidos lácticos que al inocular los gránulos en concentración 10 % p/v. Sin embargo la acidificación, degradación de lactosa y producción de ácidos orgánicos es menor al emplear menor concentración de inóculo. Se seleccionó por lo tanto el empleo de gránulos en concentración 10 % p/v a fin de aumentar la velocidad de fermentación. (6)

2.2 Bases teóricas

2.2.1 Granos de Kéfir

La historia del kéfir se pierde en el tiempo. Se considera su origen en el norte del Cauc seo (China). Desde tiempos inmemorables, los habitantes de estas montañas aprendieron a elaborar una bebida refrescante a partir de la leche de vaca y cabra utilizando un cultivo con una forma especial: los granos de kéfir. (4)

Nadie sabe dónde ni cómo se originaron estos granos, pero entre los tártaros existe la leyenda de que fue el mismo Mahoma quien recibí los granos de Ala, y este a su vez los transmití a los musulmanes. Ense ndoles su utilización y prohibiéndoles enseñar su uso a los infieles, ya que si esto ocurría, los granos de kéfir (también denominados "mijo del profeta"). Esta leyenda explica por qué los granos de kéfir y los

métodos empleados en la fabricación del kéfir fueron un secreto por un largo tiempo. (4)

Los médicos rusos, se dieron cuenta del efecto beneficioso del kéfir en las enfermedades del intestino y el estómago, y el primer trabajo científico acerca del kéfir fue publicado a finales del siglo pasado. (4, 21)

Los granos de kéfir se caracterizan por tener una forma irregular, una superficie arrugada, un color blanco o ligeramente amarillento, una consistencia elástica y un específico sabor ácido, son unos cultivos acusadamente simbióticos con estructura determinada. Este grano se comporta biológicamente como un organismo vivo. Crece, se multiplica y transmite sus características a las siguientes generaciones. (4, 21)

El diámetro de los granos puede variar entre 1-2 a 3 a 6 cm o más, y los granos activos de kéfir flotan en la superficie de la leche. (4, 21)

Durante la fermentación, los granos de kéfir se hinchan y ascienden poco a poco a la superficie.

La compleja microflora presente en el grano de kéfir se encuentra inmovilizada en una matriz compuesta por un polisacárido llamado kéfirán, que es de origen microbiológico. Algunas grasas de leche y proteínas desnaturalizadas de la misma, se encuentran también relacionadas con esta matriz. (4, 21)

2.2.2 La Microflora del Kéfir

La microflora básica del grano de kéfir se encuentra compuesta por bacterias ácido lácticas, bacterias ácido acéticas y levaduras. Su distribución en los diferentes estratos del grano de kéfir, han sido demostrados en diferentes trabajos. (4, 21)

La actividad antimicrobiana del kéfir se atribuye al ácido láctico, ácido acético, peróxido de hidrogeno, dióxido de carbono, diacetilo, acetaldehído, y/o bacteriocinas producidos por *Lactobacillus*. También se ha encontrado que el kéfir inhibiría la germinación de endosporas de *Bacillus cereus* y, si los Granos de Kéfir se hallaran contaminados con endosporas de este patógeno, paulatinamente irían perdiendo dicha contaminación hasta desaparecer a través de los sucesivos repiques en leche no contaminada. (4, 5, 7, 21)

Las levaduras que no fermentan la lactosa se encuentran ubicadas en los estratos profundos del Grano de Kéfir, mientras que las levaduras que fermentan la lactosa se encuentran presentes principalmente en las capas periféricas. La microflora de la superficie del Grano de Kéfir, incluye *Streptococci mesofilicos*, *Lactobacilos mesofilos*, *Lactobacilos termófilos* y bacterias ácido acéticas. (4, 21)

Una relación de los principales microorganismos presentes tanto en los Granos de Kéfir como en la bebida kéfir se presenta en el cuadro N° 1. (4).

TABLA No 1: MICROFLORA DE LOS GRANOS DE KÉFIR Y DE LA BEBIDA DE KÉFIR.

Microflora	Granos de kefir	Bebida Kefir
LEVADURAS		
1.- <i>Saccharomyces delbrueckii</i>	106/ g	105/ g
LACTOBACILOS		
1.- Lb. Kefir	109/ g	106/ ml - 108/ ml
2.- Lb. Brevis	109/ g	106/ ml
3.- Lb. Acidophilus	109/ g
STREPTOCOCCI		
1.- Sr. Durans	Ausente	106/ g
LACTOCOCCI		
1.- Lact. Lactis	Ausente	109/ ml
LEUCONOSTOC		
1.- Leuc. Mesenteroides	106/ g	109/ ml
BACTERIAS ACIDO ACÉTICAS	108/ g	106/ ml

2.2.3 Actividad Antibiótica de los Granos de Kéfir.

El efecto antimicrobiano de las BAL (bacterias ácido lácticas) contra otras bacterias se conoce desde hace muchos años. Metchnikof señalaba que una flora nativa intestinal estable regula la toxemia crónica natural que tiene un papel primordial en el envejecimiento y muerte. Aparte de la competencia por sustratos, los sitios de colonización y los productos de la fermentación, resultan inhibitorios para muchos patógenos. (5, 13)

Los coliformes son activamente inhibidos por la microflora natural del kéfir y bacterias patógenas tales como la Shiguella y Salmonella, no se desarrollan cuando son introducidas en la leche junto con el starter del kéfir. Asimismo, el desarrollo del bacilo de la tuberculosis es inhibido en presencia de la microflora de los Granos de Kéfir. (4)

También se ha demostrado que el kéfir inhibe el crecimiento de *Streptococcus pyogenes* y *Candida albicans*; en otro estudio, cepas de *Lactococcus lactis subsp. Lactis*, *L. lactis subsp. Ceremonis* y *L. thermophilus*, aislados de kéfir inhibieron el crecimiento

de *S. aureus*. Además, dos cepas de *L. lactis* y una cepa de *L. ceremonis* inhibieron el crecimiento de *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa*; se ha descrito también que una bacteriocina producida por una cepa clasificada como *Lactobacillus spp.* Tiene actividad contra *listeria innocua F*; finalmente un número de *Lactobacillus spp.* Aislados a partir de kéfir presentaron actividad antimicrobiana contra bacterias enteropatógenas y afectaron la adhesión de *salmonella typhimurium* a células Caco-2. (7)

2.2.4. Bacteriocinas

Las bacteriocinas son producidas especialmente por lactococos y lactobacilos. Se caracterizan por presentar una actividad bactericida dirigida hacia bacterias gram positivas; en cambio, las bacterias gram negativas son pocas sensibles a estas sustancias debido a la constitución de su pared celular y membrana. (5, 7, 11)

Las bacteriocinas se definen como péptidos biológicamente activos que tienen propiedades inhibitorias contra otras especies estrechamente relacionadas con la cepa productora (5). El interés por las mismas deriva del hecho de que son producidas por organismos que se encuentran en los alimentos y, por esta razón, podrían ser consideradas como "naturales" y, por lo tanto, más admisibles que los conservadores químicos. Las bacteriocinas pueden usarse en conservación de alimentos en su forma natural o mediante cultivos iniciadores que forman bacteriocinas en los alimentos. El uso potencial de estos productos y el de determinadas enzimas en

conservación de alimentos se describe con el término «bioconservación». (7)

2.2.5 Antagonismo Láctico

El ácido láctico es producido por la vía homofermentativa de las BAL, puede interactuar con las membranas celulares y causar acidificación intracelular y desnaturalización de proteínas; sin embargo, por la vía heterofermentativa se produce en pequeñas cantidades junto con el ácido acético, etanol y dióxido de carbono. El grado de disociación del ácido láctico depende del pH, donde un bajo pH se encuentra en la forma no disociada, siendo tóxico para hongos, levaduras y varias bacterias. En la actividad antimicrobiana, los isómeros del ácido láctico difieren, ya que el ácido L-láctico es más inhibitorio que el isómero D-láctico. (5)

2.2.6 Resistencia Bacteriana

Las bacterias, por su tremenda capacidad de adaptación, pueden desarrollar mecanismos de resistencia frente a los antibióticos. Existe una resistencia natural o intrínseca en las bacterias si carecen de diana para un antibiótico (como la falta de pared celular en el Mycoplasma, en relación con los betalactámicos). La resistencia adquirida es la realmente importante desde un punto de vista clínico; es debida a la modificación de la carga genética de la bacteria y puede aparecer por mutación cromosómica o por mecanismos de transferencia genética. La primera puede ir seguida de la selección de las mutantes resistentes como ocurre con la rifampicina y macrólidos; pero la resistencia transmisible es la más

importante, estando mediada por plásmidos, transposones o integrones, que pueden pasar de una bacteria a otra. (3, 15, 16)

La resistencia a los antibióticos recién se está empezando a ver como una preocupación de la sociedad y, desde el punto de vista económico, como un elemento negativo. (3) Es importante considerar que en la práctica diaria los distintos tipos y mecanismos de resistencia que presentan las bacterias frente a los antimicrobianos disponibles, ya que es sabido que las infecciones causadas por bacterias resistentes se asocian a una mayor morbilidad, mortalidad y coste que las causadas por bacterias sensibles de la misma especie. (15)

2.2.7 Heridas infectadas en diabéticos

Dependiendo de la gravedad o extensión de la lesión, las infecciones serán mono o polimicrobianas, siendo la etiología más frecuente en los episodios monomicrobianos los microorganismos gram positivos y, más específicamente, los estafilococos. Cuando la infección se agrava se hace polimicrobiana y, a pesar de que los microorganismos gram positivos siguen siendo los más frecuentemente aislados, a menudo también están presentes bacilos gramnegativos (9, 17, 18)

En dos ensayos clínicos recientemente publicados sobre “pie diabético”, los cocos gram positivos representaron del 70 al 80% de los aislamientos, situándose la incidencia de *S. aureus* meticilino-resistente entre el 5 y 15%, aunque en algunas series estos porcentajes

llegaron a representar hasta el 30% de incidencia, por lo que el conocimiento de la flora local de la herida es recomendable dada la gran variabilidad de estudios. El conocimiento de la presencia o no de *S. aureus* meticilino-resistente, a su vez, es importante porque se asocia con una pobre cicatrización, bacteriemia, mayor incidencia de pérdida de extremidad y mortalidad por septicemia. (9, 17, 18)

2.3 Definición de Términos básicos.

- **Kéfir:** es una bebida láctea fermentada naturalmente carbonatada con un sabor ligeramente ácido, a levadura y e consistencia cremosa. Cuando se agita, la bebida produce espuma y efervescencia, característica por la que se le ha denominado la champaña de los productos lácteos cultivados.
- **Granos de kéfir:** son cultivos acusadamente simbióticos con estructura determinada. Este grano se comporta biológicamente como un organismo vivo. Crece, se multiplica y transmite sus características a las siguientes generaciones.
- **Bacterias gram (+):** grupo de bacterias que se tiñen de azul oscuro o violeta por la tinción gram.
- **Bacterias gram (-):** grupo de bacterias que aparecen coloreadas de color rosa cuando se utiliza la técnica de coloración de gram.
- **Infeción:** invasión y multiplicación de agentes patógenos en los tejidos de un organismo.
- **Diabetes:** la diabetes es una afección crónica que se desencadena cuando el organismo pierde su capacidad de producir suficiente insulina o de utilizarla con eficacia.

- **Cicatrización:** proceso que tiene como finalidad la restauración de la integridad física a través de la formación de tejido fibroconectivo.
- **Inflamación:** respuesta protectora del organismo, ante una agresión, cuyo objetivo final es destruir, diluir o aislar la causa inicial de la lesión celular y reparar el daño causado.
- **Escala de Mc Farland:** la utilidad de la escala es poder realizar suspensiones bacterianas ajustadas a un patrón, generalmente se suele usar el 0,5 Mc Farland, para esto se toma una muestra de nuestra bacteria y la inoculamos en un tubo con una solución salina, en el momento que se produzca un poco de turbidez ya estamos en el 0,5.
- **Prueba de chi cuadrado:** Esta prueba puede utilizarse incluso con datos medibles en una escala nominal. La hipótesis nula de la prueba Chi-cuadrado postula una distribución de probabilidad totalmente especificada como el modelo matemático de la población que ha generado la muestra.
- **Antagonismo Láctico:** el ácido Láctico puede interactuar con las membranas celulares y causar acidificación intracelular y desnaturalización de proteínas.
- **Bacteriocinas:** sustancias químicas producidas por bacterias, las cuales se caracterizan por presentar una actividad bactericida.

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1. Tipo

El presente trabajo de investigación es experimental y exploratorio. (28)

3.2. Diseño

El presente trabajo de investigación es transversal. (28)

3.3. Población y Muestra

Población: Ratas blancas (*rattus norvegicus*) del bioterio de la Universidad Agraria la Molina.

Muestra: 24 ratas blancas (*rattus norvegicus*)

3.4. Metodología.

3.4.1. Materiales

Agente biológico:

- a) Granos de kéfir proveniente de dos casas naturistas de Lima.
- b) Ratas blancas "*Rattus norvegicus*" de 3 meses de edad de sexo femenino entre 120 y 160 g de peso, provenientes del bioterio de la Universidad Nacional Agraria la Molina de la facultad de Zootecnia.
- c) Cepas de bacterias gram positivas y gram negativas obtenidas de un laboratorio de análisis clínico.

Materiales de laboratorio:

- a) Módulo básico de biología experimental.
- b) Escala de Mc Farland.

3.4.2. Método.

- a) Se tomarán 24 ratas blancas "*Rattus norvegicus*" y se dividirán en cuatro (04) grupos de seis (06) ratas cada grupo, llamados grupo E1, C1, E2 y C2. En donde:
 - E1: Grupo de ratas infectadas con bacterias Gram + y tratadas con granos de kéfir.
 - C1: Grupo de ratas infectadas con bacterias Gram + y sin aplicación de granos de kéfir.
 - E2: Grupo de ratas infectadas con bacterias Gram - y tratadas con granos de kéfir.
 - C2: Grupo de ratas infectadas con bacterias Gram - y sin aplicación de granos de kéfir.

- b) A las 24 ratas se les practicará una herida abierta de 2,50 cm de largo y 1 mm de profundidad en el lomo posterior derecho. Para esto se les afeitará dicho espacio una superficie de 2 cm de ancho por 3 cm de largo, es decir 6 cm², (20)

- c) Al grupo E1 se le aplicará 3 gotas de una suspensión salina de la bacteria gram positiva a una concentración de 10⁸ bacterias/ml graduadas de acuerdo a la escala No. (1.5) de Mc Farland, asegurándose que la suspensión se extienda por toda la herida a fin de que se asegure la infección inherente. Transcurrido 60 minutos se le aplicará un emplasto de granos de kéfir a la herida infectada, tratando que estas estén en contacto íntimo.

- d) Al grupo E2 se le aplicará 3 gotas de una suspensión salina de la bacteria gram negativas a una concentración de 10^8 bacterias/ml graduadas de acuerdo a la escala No. (1.5) de Mc Farland, asegurándose que la suspensión se extienda por toda la herida a fin de que se asegure la infección inherente. Transcurrido 60 minutos se le aplicará un emplasto de granos de kéfir a la herida infectada, tratando que estas estén en contacto íntimo.
- e) Al grupo C1 se le aplicará 3 gotas de una suspensión salina de la bacteria gram positiva a una concentración de 10^8 bacterias/ml graduadas de acuerdo a la escala No. (1.5) de Mc Farland, asegurándose que la suspensión se extienda por toda la herida a fin de que se asegure la infección inherente.
- f) Al grupo C2 se le aplicará 3 gotas de una suspensión salina de la bacteria gram negativa a una concentración de 10^8 bacterias/ml graduadas de acuerdo a la escala No. (1.5) de Mc Farland, asegurándose que la suspensión se extienda por toda la herida a fin de que se asegure la infección inherente.
- g) Se harán revisiones periódicas de las heridas cada 8 horas y se registrarán los siguientes datos (cicatrización de la herida, presencia o ausencia de infección y su evolución).
- h) El tiempo de experimentación será por un periodo de 7 días.

3.5 Variable e Indicadores

3.5.1 Variable Independiente

- Actividad antibiótica de los granos de kéfir

3.5.2 Variable Dependiente

- Cicatrización de las heridas infectadas de las ratas.

3.6 Técnicas e Instrumentos de Recolección de Datos.

- Prueba estadística de Chi cuadrado X^2 . (18, 19)
- Tabla de recopilación de dato.

CAPITULO IV

PRESENTACIÓN, ANÁLISIS E INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

4.1 Presentación de resultados

En los anexos N°1, N°2, N°3 y N°4 se presentan los resultados obtenidos de la evolución diaria de las heridas infectadas de las ratas de los grupos E1, C1, E2 y C2, durante siete días.

En la tabla 2 se muestra los resultados del efecto de los granos de kefir sobre las heridas infectadas en las ratas en estudio.

Tabla 2: Resultados de la actividad antibiótica de los granos de kéfir.

	INFECCIÓN CON GRAM +		INFECCIÓN CON GRAM -	
	CON KEFIR	SIN KEFIR	CON KEFIR	SIN KEFIR
SUPERVIVENCIA	6	6	6	3
GRADO DE INFECCION	++	+++	+	+++
CRECIMIENTO DE PELO	+++	++	+	+
CICATRIZACIÓN	+++	+	++	++

Fuente: Propia.

Imagen N°1: Corte de pelo del lomo de la rata.



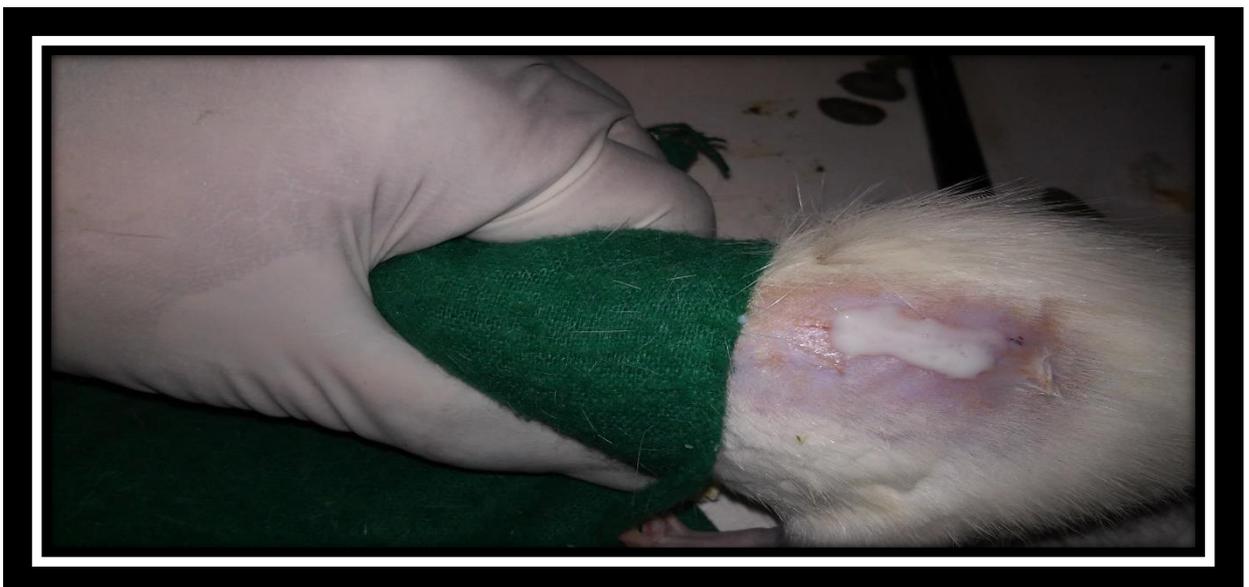
Fuente: Propia.

Imagen N°2: Corte e inoculación de la cepa bacteriana.



Fuente: Propia.

Imagen N°3: Aplicación de los emplastos de granos de kéfir.



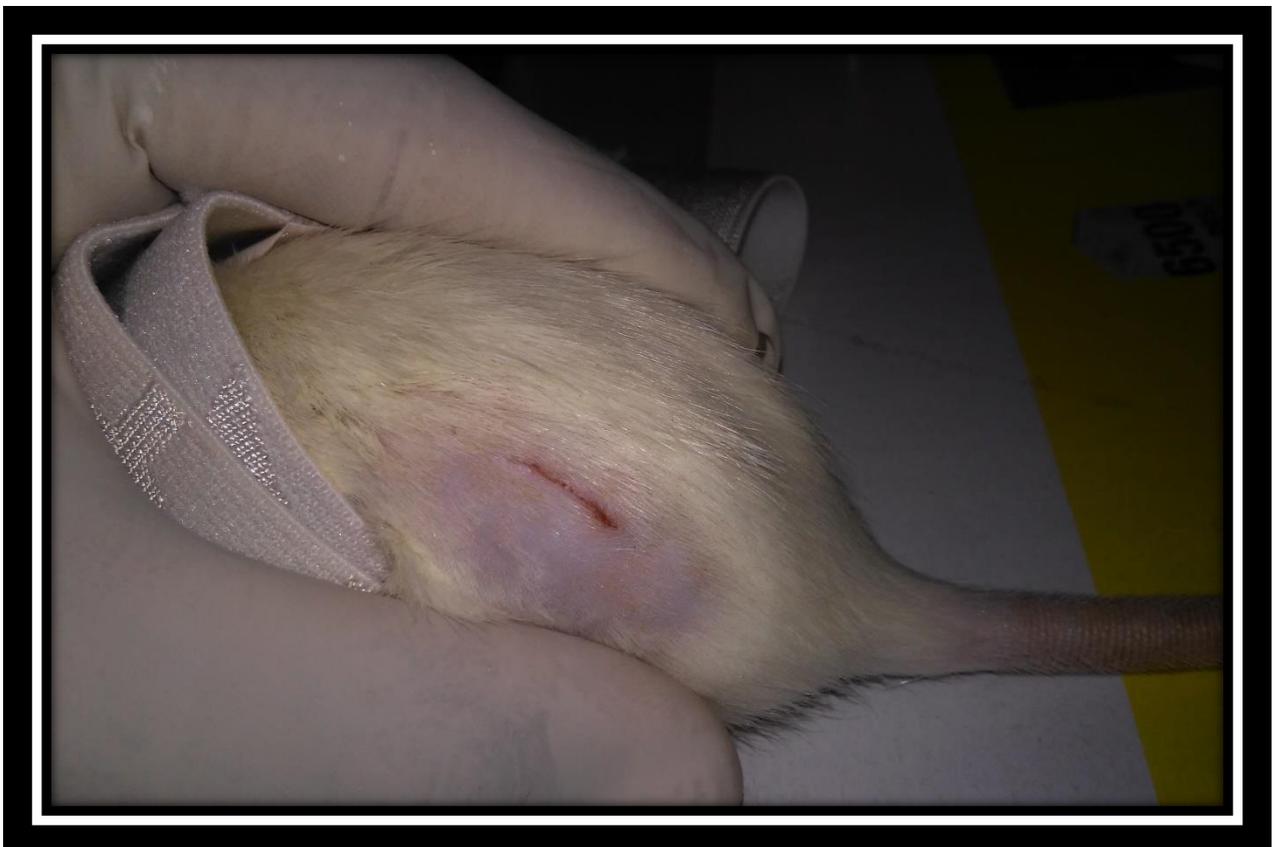
Fuente: Propia.

Imagen N°4: Granos de kéfir.



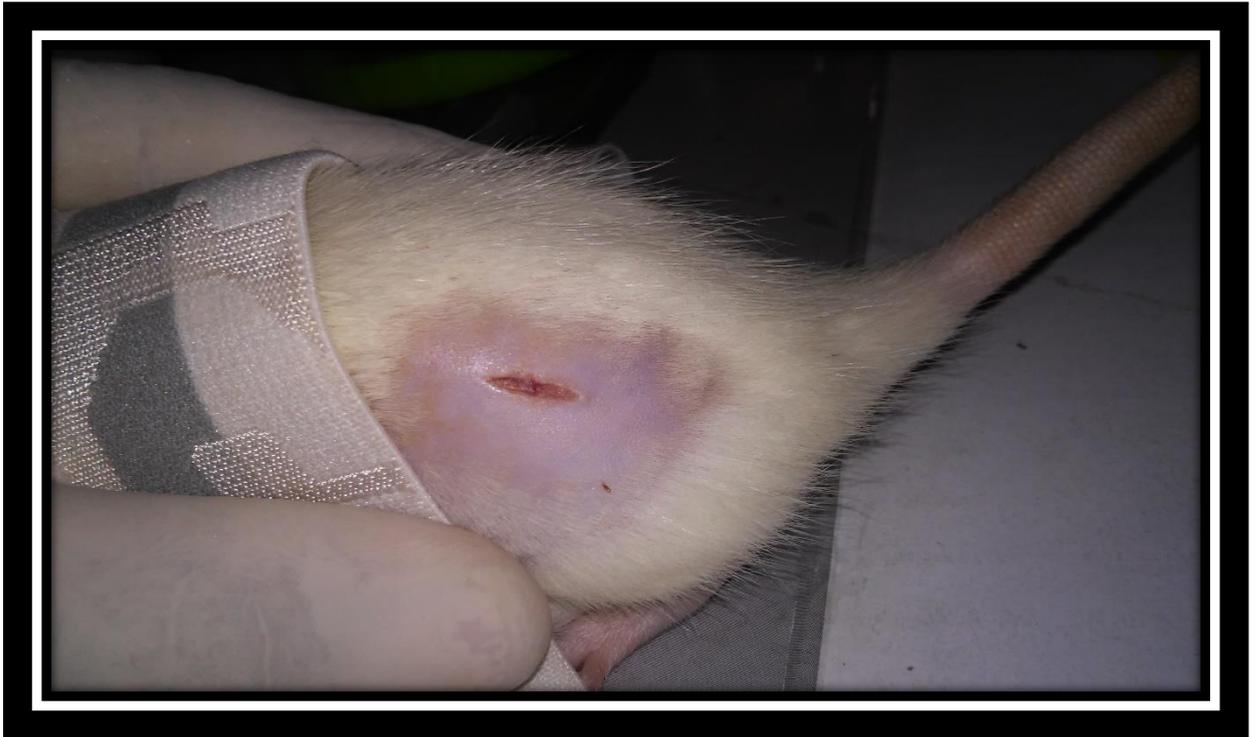
Fuente: Propia.

Imagen N°5: Cicatrización y crecimiento de cabello.



Fuente: Propia.

Imagen N°6: Cicatrización y crecimiento de cabello.



Fuente: Propia.

Imagen N°7: Cicatrización y crecimiento de cabello.



Fuente: Propia.

En el anexo No. 5 se muestra las *Tablas de Contingencia* y el desarrollo de la Prueba Estadística Chi Cuadrado respectiva, en relación a la supervivencia de las ratas infectadas con bacterias gram -. Del resultado de la prueba se puede colegir que los granos de kéfir tienen efecto significativo sobre la curación y supervivencia de las ratas en estudio.

DISCUSIÓN

De los resultados obtenidos se puede observar que los granos de kéfir tienen efecto desinfectante sobre las heridas infectadas de las ratas en estudio y, por lo tanto, determinante para la cicatrización y curación de las mismas.

Al hacer un análisis global y exhaustivo de los resultados se evidencia que dichos resultados van más allá de una cicatrización o curación de las heridas, ya que el empleo de los granos de kéfir para combatir la infección en las heridas de las ratas, hace la diferencia entre la supervivencia o la muerte de los animales de experimentación.

Lo dicho anteriormente es consecuencia del resultado respecto a este punto, ya que de la tabla 2, se puede extraer que de las 6 ratas del grupo experimental que fueron infectadas con bacterias gram – y tratadas con granos de kéfir, las 6 vivieron; en tanto que de las 6 ratas infectadas con bacterias gram – del grupo control, esto es, que no fueron tratadas con granos de kéfir, 3 de ellas murieron y 3 vivieron. Esto quiere decir que los granos de kéfir tienen efecto curativo sobre las heridas infectadas, combaten la infección y ayudan a la cicatrización y curación de las mismas. Este hecho puede ser explicado tanto por el antagonismo láctico que presenta los granos de kéfir (5,6,7) como por la producción de bacteriocinas (5,6,7) por parte de la misma microbiota, los cuales tienen efecto antibiótico sobre las bacterias que infectan las heridas de las ratas. Esta aseveración además es respaldada con la prueba Chi Cuadrado (18,19) que se ha realizado y cuyo texto completo de la misma se encuentra en el apéndice (5 6,7).

Por otro lado, en el caso del estudio realizado con bacterias gram +, aun cuando el resultado es diferente, no deja de tener correlación con lo realizado con bacterias gram -, pues si bien es cierto que no se presentó mortalidad en el grupo control, es cierto también que los granos de kéfir juegan un rol importante en el propósito de combatir la infección y facilitar la cicatrización y curación de las mismas, ya que el grado de infección para las ratas que no recibieron el tratamiento con los granos de kéfir fue más severa que para las que recibieron

tratamiento con granos de kéfir. Esto se puede corroborar al hacer las comparaciones respectivas de las heridas infectadas del grupo control y experimental que se presentan en las figuras. Adicionalmente, respecto a esta prueba en particular, es posible que esto se deba al hecho de que las ratas, inherentemente, tienen mayor inmunidad a las bacterias gram +, y por lo tanto explique la supervivencia de las ratas en este grupo de estudio, las cuales fueron infectadas con bacterias gram +.

Como otro punto de importancia tenemos el crecimiento del pelo alrededor de las heridas. Como se puede observar en la figura N°5, es claro que las heridas con mayor infección e inflamación son las correspondientes a las ratas que no fueron tratadas con granos de kéfir y, por ende, la caída del pelo circundante a la herida se hace visible debido a la inflamación e infección severa que ahí se presenta, en tanto que en las ratas que recibieron tratamiento con granos de kéfir, el crecimiento del pelo fue, al parecer normal, debido a que como se combate la infección, la inflamación también está disminuida, de tal manera que no afecta o afecta muy poco a los folículos pilosos circundantes a la herida.

Finalmente, respecto a la cicatrización de las heridas, es claro que esto es consecuencia de una infección superada y una inflamación controlada, por lo que una vez más se puede decir que los granos de kéfir tienen un efecto cicatrizante sobre las heridas de las ratas en estudio por las razones ya expuestas, pues, en general, las ratas que recibieron tratamiento con granos de kéfir, pudieron cicatrizar sus heridas con más facilidad y en menor tiempo que las ratas que no recibieron el tratamiento con los granos de kéfir. Lo mencionado se puede observar en las figura N°5, N°6 y N°7, y en el apéndice donde se hace un registro diario de las evolución de las heridas de la totalidad de las ratas en estudio.

Así pues, a la luz de los resultados obtenidos en este estudio, es evidente que los granos de kéfir juegan un papel determinante en la desinfección, cicatrización y curación de las heridas infectadas de las ratas estudiadas, sea esta infección causada por bacterias gram + como por bacterias gram -.

CONCLUSIONES

1. Los granos de kéfir tienen efecto antibiótico sobre heridas infectadas tanto por bacterias gram +, como por bacterias gram -.
2. Los granos de kéfir deben su efecto curativo, antibiótico y disminuyen la inflamación de las heridas, merced a su antagonismo láctico y a la producción de bacteriocinas.
3. Los granos de kéfir tienen mayor efecto antibiótico en las bacterias gram +, que en las gram -, esto se pudo corroborar con los resultados obtenidos, debido a que la tasa de mortalidad en las ratas del grupo E1 fue nula, a diferencia de las del grupo E2 donde murieron tres de ellas.
4. Los granos de kéfir ayudan a la pronta cicatrización de las heridas infectadas en ratas debido a que controlan la infección y por ende la inflamación de las mismas, ayudando también al pronto crecimiento del pelaje en el área afectada.

RECOMENDACIÓN

En base a los resultados obtenidos en este estudio, se recomienda profundizar la investigación a fin de tener nuevos descubrimientos, que conduzcan a la aplicación de los beneficios de los granos de kéfir, para el tratamiento de heridas infectadas en seres humanos; sobre todo en pacientes diabeticos, en los cuales la cicatrización de las heridas es un verdadero problema de salud.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rosales Tham Doris, Figueroa La Torre Diana. Vademécum farmacológico antibiótico. 2da ed. Lima: Nueva Facultad; 2010
2. LEON RAMIREZ S. Resistencia bacteriana a los antimicrobianos. Medaly.org. 2010; volumen 16(1): 859-860. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=48719442001>
3. OMS; Estrategia Mundial de la OMS para contener la resistencia a los antimicrobianos. Revista OMS; 2001. Disponible en: <http://www.who.int/drugresistance/SpGlobal2.pdf>
4. Sasaki Tamaki D. Elaboración del kéfir [tesis licenciatura]. Lima: Universidad Nacional Agraria la Molina. Facultad de Ingeniería Alimentaria; 1995.
5. Ramírez Cuenca M. Actividad inhibitoria de cepas de bacterias ácido lácticas frente a bacterias patógenas y deterioradoras de alimentos [tesis licenciatura]. España: Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo; 2005
6. Londero Alejandra. Obtención de un producto probiotico para aves a partir de suero de quesería fermentado con microorganismo de kéfir [tesis doctoral]. Argentina: Universidad Nacional de la Plata; 2012.
7. J. Anselmo Ricardo, Silvia S. Viera, Pablo A. Ojeda, Lucia L. Lausada. Efecto antagónico del kéfir sobre endosporas y células vegetativas de Bacilos cereus y Clostridium Perfringes. Buenos Aires: Depto. De ciencias básicas; 2010. Información tecnológica volumen 21(4):131-138.
8. Martínez Moreno M. fisiopatología médica: una introducción a la medicina clínica. 5ta edición. Colombia: Manual moderno; 2005. Pp. 513-38
9. Harrison. Principios de medicina interna. 18ª edición. China: industria editorial mexicana; 2012.
10. J. Gérvas; Atención Primaria. La resistencia a los antibióticos, un problema de Salud Pública. Vol. 25. Madrid: Cesca; 2000

11. Izildinha M, Lerayen A, Freitas leitao M. Detection and characterization of Bacteriocin. Producing lactococcus lactis Strains [abstract]. Revista de microbiología. 1999; (30): 130-136.
12. Hassan Fallah H, Golmar Rahimzadeh, Mohammad Reza F, Mitra Mehrazma, Mitra salchi. Evalatuion of wound healing activities of kéfir products [abstract]. ELSEIVER. 2011; 1-5.
13. Santa Rosa A. Estandarización del proceso de ultrapasteurizada con granos de kéfir [tesis licenciatura]. El salvador: Universidad de el Salvador; 2012
14. Arévalo Ortiz F. Obtención de la microbiota de los granos de kéfir. (tesis maestría). Lima: universidad nacional mayor de san maros; 2005.
15. Daza Pérez, Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. Sistema Nacional de Salud. 1998; 22: 57-67.
16. Leveau J Y, Boux M. Microbiología Industrial. Zaragoza: Editorial Acribia; 2000.
17. Patrick R. Murray, Ken S. Rusenthal, Michael A. Pfaller. Microbiología médica. 7^{ma} edición. España: ELSEIVER; 2010.
18. Vidal Julio.; Poliana Cristian.; Abel José. Uso de Antibióticos en Infecciones del Pie Diabético. Revista de Postgrado de la VIA Cátedra de Medicina. N^o 185; 2008
19. R.J, S Viora y L.I Lausada, Efecto bactericida del Kéfir sobre *Salmonella* spp. Rev. Información tecnológica, chile, 12(5) 91-96 (2001).
20. Arroyo J, Cisneros C. Modelos experimentales de investigación farmacológica. 1era edición. Perú: ASDIMOR S.A.C; 2012.
21. Rosales Tham Doris, Diana Figueroa La Torre. Vademécum farmacológico antibiótico. 2da ed. Lima: Nueva Facultad; 2010
22. Alvarado J. Apuntes de farmacología. 3era edición. Perú: AMP ediciones; 2008.
23. R.K. Robinson, Microbiología lactologica. Volumen I. Zaragoza; 1987.

24. Arévalo Ortiz F.; Arias Arroyo G. estudio comparativo del efecto de las temperaturas constantes y variable ambiente en la producción de biomasa proveniente de la microbiota del grano de kéfir. Ciencia e investigación UNMSM. 2007;10(1)
25. Semih ot.es. ; Oz.en Cagindi. Kéfir: A probiotic Dary-composition, nutritional and therapeutic aspects. Pakistan journal of nutrition. 2003; volumen 2(2): 54-59
26. Koolman. Bioquímica. 3era ed. Madrid: Medico panamericana; 2004.
27. T. Bakhsandeh, R. Pourahmad, A. Sharifan, A. Moghimi. Journal of food Biosciences and technology [abstract]. 2011; volumen (1): 11-18

ANEXOS

Anexo N°5: Tablas de contingencia

OBS.	VIVE	MUERE	TOTAL
Con Kéfir	6	0	6
Sin Kéfir	3	3	6
Total	9	3	12

ESP.	VIVE	MUERE	TOTAL
Con Kéfir	4.5	1.5	6
Sin Kéfir	4.5	1.5	6
Total	9	3	12

Ho: El Kéfir no tiene efecto curativo.

Hi: El Kéfir si tiene efecto curativo.

SIG: 0.05

$$GL = (F-1) (K-1) = (2-1) (2-1) = 1$$

X^2 Tabulado con 0.05 / GL = 3.84

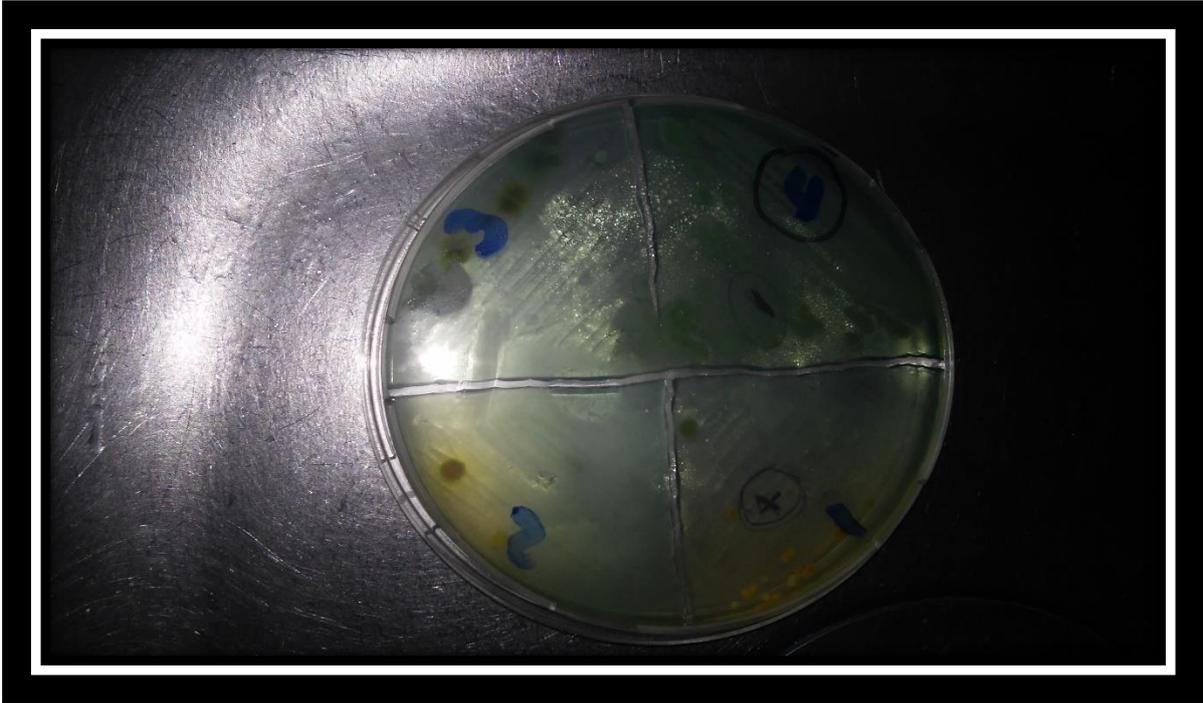
$$X^2 \text{ Calc.} = (6-4.5)^2/4.5 + (0-1.5)^2/1.5 + (3-4.5)^2/4.5 + (3-1.5)^2/1.5$$

$$X^2 \text{ Calc} = 0.50 + 1.50 + 0.50 + 1.50$$

$$X^2 \text{ Calc} = 4.$$

Como X^2 Calculado es mayor que X^2 tabulado, se acepta (Hi).

Anexo N°6: Cepas de bacterias Gram + y Gram –



Anexo N°7: Tubos de ensayo con la dilución de las bacterias.



Anexo N°8: Ratas para el trabajo de experimentación.



Anexo N°9: Proceso de afeitado del lomo de las ratas.



Anexo N°10: Lomo descubierto para proceder a realizar corte.



Anexo N°11: corte realizado para proceder a inocular las bacterias, e inducir la infección.



Anexo N°12: Inoculación de la cepa bacteriana respectiva.



Anexo N°13: Preparación del emplasto de granos de kéfir.



Anexo N°14: Aplicación del emplasto de kéfir.

