

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DE
EXTRACTOS DE PROPOLEOS DE DIFERENTES ZONAS DE EL SALVADOR

TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR
EDWIN ALEXIS BELTRAN HERRERA
MARLON NOE FIGUEROA DERAS

PARA OPTAR AL GRADO DE:
LICENCIADO EN QUIMICA Y FARMACIA

NOVIEMBRE 2021

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

MAESTRO ROGER ARMANDO ARIAS ALVARADO

SECRETARIO

ING. FRANCISCO ANTONIO ALARCON SANDOVAL

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

DECANA

LICDA. REINA MARIBEL GALDAMEZ

SECRETARIA

LICDA. EUGENIA SORTO LEMUS

DIRECCION DE PROCESOS DE GRADUACION

DIRECTORA GENERAL

MSc. Cecilia Haydeé Gallardo de Velásquez

TRIBUNAL CALIFICADOR

ASESORAS DE AREA DE MICROBIOLOGIA

Dra. Tania Ethel Cuadra Zelaya

MSc. Coralia de los Ángeles González de Díaz

DOCENTE ASESOR

MSc. Mario Herbert Romero Rivera

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Dios, quien nos ha acompañado en todo momento de nuestra formación profesional y nos ha permitido alcanzar este logro; a nuestros familiares y amigos por su apoyo en todo momento.

A nuestro docente asesor MSc. Mario Herbert Romero Rivera quien nos apoyó en este último paso de nuestra carrera brindándonos su conocimiento, consejos, confianza y tiempo.

A nuestras asesoras de área, Dra Tania Cuadra y MSc. Coralia González y Directora de Trabajos de Graduación, MSc. Cecilia Gallardo, por cada una de sus sugerencias y consejos para la mejora de nuestro trabajo de graduación.

A Laboratorio de Microbiología y Aguas Residuales de la Administración Nacional de Acueductos y Alcantarillados (ANDA) por recibirnos y colaborarnos con nuestra investigación.

A Dra. Vianney Castañeda de Abrego, por su colaboración y conocimientos.

A Sr Wilber Guzmán y Sr Oscar Coreas, laboratoristas del laboratorio de Microbiología de la Facultad de Química y Farmacia por su colaboración.

¡Gracias a cada uno de ellos!

Edwin Beltrán y Marlon Figueroa.

DEDICATORIA

A Dios, por ser mi guía en esta etapa de mi vida profesional y darme la fortaleza día a día para seguir adelante y darme la sabiduría para culminar esta carrera.

A mi mamá Ana Mirian Herrera Cortez y mi padre Douglas Alfonso Beltrán Cardona por ayudarme a sacar adelante este proyecto y poder ayudarme a llevar a término esta carrera, y ser mi ejemplo por seguir.

A toda mi familia que siempre han estado conmigo y me han apoyado en todo el proceso, así como a mis familiares más cercanos, Gisela, Ana, Petrona, Cristian, que siempre han estado para brindarme su ayuda y apoyo en todo momento.

A mi docente asesor Msc. Mario Romero por apoyarnos en todo este proyecto, por su ayuda académica y personal, y por ayudarnos y brindarnos sus conocimientos en este proceso y por toda la paciencia que ha tenido hacia nosotros.

A todos los amigos que siempre han estado animándome a seguir adelante y me han apoyado en toda mi carrera, dándome su apoyo en los momentos difíciles en la carrera universitaria, y dándome su ayuda para superar todos los obstáculos que se nos presentaron.

Edwin Alexis Beltrán Herrera

DEDICATORIA

A Dios por permitirme culminar con éxito esta etapa profesional.

A mi madre Juana Deras de Figueroa y mi padre José Luis Figueroa por proveer todo lo necesario para lograr mis metas, por su amor incondicional, apoyo, palabras de aliento y creer y confiar en mí.

A mi hermano Luis Gerardo Figueroa, por estar conmigo en todo momento.

A mi compañero y amigo Edwin Beltrán, por ser el mejor equipo, por su apoyo, perseverancia, compromiso, confianza en todo momento y por enfrentar de la mejor manera cada uno de los retos que se presentaron.

A mis compañeros de área y amigos, Daniela Vargas y Kevin Díaz, por hacer más llevaderos los días difíciles y compartir su alegría en todo momento.

A mis amigos Andrea, Sofi, Walter, Diana, Gaby y Henry por haberme acompañado y dado ánimos en todo este camino.

A mi tío Arnulfo, tía Idalia, tía Tere, Mami Toña, Abuelita Élida por siempre estar pendientes de mí y llevarme en sus oraciones.

A mi prima Sandy, por ser como mi hermana que ha estado conmigo en los mejores y peores momentos.

A cada una de las personas que me animaron y apoyaron para culminar esta etapa.

Marlon Noé Figueroa Deras

INDICE

	Nº Pág
Resumen	
Capítulo I	
1.0 Introducción	xix
Capítulo II	
2.0 Objetivos	
2.1 Objetivo General	
2.2 Objetivos Específicos	
Capítulo III	
3.0 Marco Teórico	24
3.1 Propóleos	24
3.2 Composición químico de propóleos	24
3.3 Actividad biológica de propóleos	26
3.4 Actividad antimicrobiana de propóleos	27
3.5 <i>Staphylococcus aureus</i>	29
3.5.1 Generalidades	29
3.5.2 Características morfológicas	29
3.5.3 Epidemiología	30
3.5.4 Tratamiento	32
3.6 <i>Bacillus subtilis subsp. Spizizenii</i>	33
3.6.1 Generalidades	33
3.6.2 Características morfológicas	33
3.6.3 Epidemiología	34
3.6.4 Tratamiento	34
3.7 <i>Escherichia coli</i>	34

3.7.1 Generalidades	34
3.7.2 Características morfológicas	35
3.7.3 Epidemiología	36
3.7.4 Tratamiento	37
3.8 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	38
3.8.1 Generalidades	38
3.8.2 Características morfológicas	39
3.8.3 Epidemiología	40
3.8.4 Tratamiento	41
3.9 <i>Salmonella entérica serovar typhimurium</i>	42
3.9.1 Generalidades	42
3.9.2 Características morfológicas	43
3.9.3 Epidemiología	44
3.9.4 Tratamiento	44
3.10 Actividad antifúngica de propóleos	46
3.11 <i>Candida</i>	47
3.11.1 Generalidades	47
3.11.2 <i>Candida albicans</i>	47
3.11.2.1 Características morfológicas	48
3.11.2.2 Epidemiología	49
3.11.2.3 Tratamiento	49
3.12 Susceptibilidad de microorganismos	50
3.13 Metodologías utilizadas para la extracción de compuestos de propóleos	53
3.13.1 Extracción por maceración	54
3.14 Métodos para la determinación cualitativa de metabolitos secundarios	55
3.14.1 Métodos cromatográficos	55
3.14.1.1 Cromatografía en capa fina (TLC)	55

3.15 Metodologías utilizadas para evaluar la actividad antimicrobiana	56
3.15.1 Método de difusión en agar	57
3.15.2 Método de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)	59
3.15.3 Curva de muerte	60
3.15.4 Dilución salina	61
3.16 Técnicas de visualización microscópica de microorganismos	62
3.16.1 Microscopio electrónico	62

Capítulo IV

4.0 Diseño Metodológico	66
4.1 Tipo de estudio	66
4.2 Investigación bibliográfica	66
4.3 Investigación de campo	66
4.3.1 Recolección de muestras de propóleos	67
4.3.1 Universo	67
4.3.1 Muestra	67
4.3.1 Tipo de muestreo	68
4.4 Parte experimental	68
4.4.1 Identificación de muestras de propóleos	68
4.4.1.1 Descripción de características organolépticas	68
4.4.1.1.1 Color	68
4.4.1.1.2 Aspecto	68
4.4.1.1.3 Olor	69
4.4.1.1.4 Consistencia	69
4.4.1.1.5 Sabor	69

4.4.2 Preparación de extractos hidroalcohólicos de propóleos	69
4.4.3 Identificación cualitativa de metabolitos secundarios por Cromatografía en Capa Fina	70
4.4.4 Preparación de cultivo de trabajo	71
4.4.5 Verificación del recuento de las suspensiones estandarizadas	72
4.4.6 Selección de antibiótico y antimicótico como control positivo de inhibición y determinación de su Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)	73
4.4.7 Ensayo de difusión en agar	75
4.4.8 Ensayo de Concentración Mínima Inhibitoria	76
4.4.9 Ensayo de curva de muerte	77
4.4.10 Microscopía electrónica de barrido	78
Capítulo V	
5.0 Resultados y discusión de resultados	80
Capítulo VI	
6.0 Conclusiones	106
Capítulo VII	
7.0 Recomendaciones	109
Bibliografía	
Anexos	

INDICE DE ANEXOS

Anexo N°

1. Distribución de lugares de los propóleos proporcionados por apicultores colaboradores.
2. Hoja de identificación de muestras de propóleos y características organolépticas
3. Esquema de trabajo de preparación de extractos de propóleos.
4. Esquema de trabajo de identificación de metabolitos secundarios por Cromatografía en Capa Fina.
5. Esquema de trabajo para el cultivo de trabajo microbiológico.
6. Esquema de verificación de recuento de microorganismos.
7. Distribución de pocillos para selección de antibiótico y determinación de su concentración mínima inhibitoria (CMI). Placa A.
8. Distribución de pocillos para selección de antibiótico y determinación de su concentración mínima inhibitoria (CMI) placa B.
9. Esquema de trabajo para ensayo de difusión en agar.
10. Distribución de pocillos para determinación de CMI de extractos de propóleos.
11. Esquema general de trabajo para ensayo de curva de muerte.
12. (A) Extractos de propóleos en ultrasonicador. (B) Maceración de extractos de propóleos protegidos de la luz. (C) Filtración de extractos de propóleos.
13. (A) Equipo rotavapor. (B) Extracto obtenido al finalizar proceso de rotaevaporación. (C) Equipo Genevac® Ez-2 Evaporator. (D) Equipo liofilizador.
14. (A) Proceso de aplicación de extractos y estándares en cromato placa. (B) Proceso de elución de fase móvil. (C) Revelado con luz ultravioleta a 254nm. (D) Proceso de revelado químico utilizando óleum para

posteriormente calentar en hot plate a 105°C.

15. (A) Equipo BAL-TEC CPD 030 Critical Point Dryer. (B) Equipo BAL-TEC SCD 050 Sputter Coater. (C) Equipo BAL-TEC SCD 050 Sputter Coater durante el proceso de recubrimiento con oro de las muestras.
16. (A) Microscopio Electrónico de Barrido. (B) Estudiantes investigadores durante el proceso de uso del microscopio electrónico de barrido. (C) previsualización de una de las muestras.
17. Materiales, equipos y reactivos

INDICE DE FIGURAS

Figura N°		Pág. N°
1	Patrones usuales de susceptibilidad de bacterias comunes a algunos fármacos antimicrobianos bacteriostáticos y bactericidas de uso frecuente.	52
2	Métodos singulares de extracción de principios activos en productos naturales.	54
3	Disposición de gotas de caldo de cultivo en una placa de agar para contar unidades formadoras de colonias por mililitro.	61
4	Cromatografía en capa fina revelada bajo luz UV de onda corta ($\lambda=254\text{nm}$)	85
5	Cromatografía en capa fina revelada con reactivo óleum y calor (105°C).	86
6	Selección de antibiótico como control positivo de inhibición y determinación de su CMI frente a <i>Pseudomona aeruginosa</i> (Fila A-B), <i>Salmonella typhimurium</i> (Fila C-D) y <i>Escherichia coli</i> (E-F). Fila G-H: control de esterilidad	89
7	Selección de antibiótico y antimicótico como control positivo de inhibición y determinación de su CMI frente a <i>Staphylococcus aureus</i> (Filas A-B), <i>Bacillus subtilis</i> (Filas B-C) y <i>Candida albicans</i> (Fila E). Filas F-H: control de esterilidad.	90
8	(A) Ejemplo de ausencia de zona de inhibición y (B) Presencia de zona de inhibición por extracto de propóleos de San Alejo, La Unión frente a <i>Bacillus subtilis subesp. spizizenii</i> ATCC 6633.	91

9	Diámetros de zonas de inhibición producidas por los extractos de propóleos de San Alejo, La Unión.	92
10	Diámetros de zonas de inhibición producidas por los extractos de propóleos de Huizúcar, La Libertad	92
11	Determinación de CMI. (A) Extracto de propóleos de Huizúcar, La Libertad frente a <i>Salmonella entérica serovar typhimurium ATCC14028</i> . (B) Extracto de propóleos de San Alejo, La Unión frente a <i>Bacillus subtilis subsp. spizizenii ATCC6633</i>	97
12	Curva de muerte <i>Salmonella entérica serovar typhimurium ATCC14028</i>	99
13	Curva de muerte <i>Bacillus subtilis subsp. spizizenii ATCC6633</i>	100
14	Micrografías electrónicas de barrido de: (A) <i>Salmonella typhimurium</i> sin tratamiento (ampliación: x3500), (B) <i>Salmonella typhimurium</i> con amikacina (ampliación: x600), (C) <i>Salmonella typhimurium</i> con extracto de propóleos de Huizúcar, La Libertad (ampliación: x650), (D) <i>Bacillus subtilis</i> sin tratamiento (ampliación: x4000), (E) <i>Bacillus subtilis</i> con amikacina (ampliación: x500), (F) <i>Bacillus subtilis</i> con extracto de propóleos de San Alejo, La Unión (ampliación x650)	102

INDICE DE CUADROS

Cuadro N°		Pág N°
1	Composición cualitativa principal de propóleos.	27
2	Microorganismos frente a los cuales se ha evidenciado actividad antimicrobiana de propóleos.	29
3	Clasificación taxonómica de <i>Staphylococcus aureus</i> .	31
4	Clasificación taxonómica de <i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i> .	34
5	Clasificación taxonómica de <i>Escherichia coli</i> .	36
6	Clasificación taxonómica de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	50
7	Clasificación taxonómica de <i>Salmonella typhimurium</i> .	44
8	Clasificación taxonómica de <i>Candida albicans</i> .	49
9	Tabla de referencia para evaluar susceptibilidad.	60
10	Resultados de propiedades organolépticas de muestras crudas de propóleos.	81
11	Porcentajes de rendimiento de extractos secos de propóleos.	83
12	Resultado de perfil cromatográfico de extractos de propóleos	87

ABREVIATURAS

μL:	Microlitros
μm:	Micrómetro
CMI:	Concentración Mínima Inhibitoria
DMSO:	Dimetilsulfóxido
DNA:	Ácido desoxirribonucleico
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
EHEC:	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EIEC:	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasora
EPEC:	<i>Escherichia coli</i> enteropatógena
ETEC:	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica
g:	Gramos
HUS:	Síndrome Urémico Hemolítico
L:	Litros
mL:	Mililitros
mm:	Milímetros
NCCLS:	National Committee for Clinical Laboratory Standards
RNA:	Ácido ribonucleico
SEM:	Microscopia Electrónica de Barrido Scanning Electron Microscopy
TLC:	Cromatografía en Capa Fina Thin Layer Chromatography
TMP-SMX:	Trimetroprim Sulfametoxazol
UFC:	Unidades Formadoras de Colonias

RESUMEN

Los propóleos son un producto natural y resinoso recolectado por las abejas *Apis mellifera*, utilizados por las abejas para la construcción, reparación y protección de las colmenas, debido a sus propiedades mecánicas y actividades biológicas. El objetivo principal de esta investigación fue evaluar la actividad antibacteriana *in vitro* de extractos de propóleos de diferentes zonas de El Salvador, describiendo las características organolépticas de los propóleos, y preparación de extractos hidroalcohólicos, por maceración asistido de ultrasonido y secados por liofilización. Luego se determinaron las propiedades químicas identificando cualitativamente metabolitos secundarios por TLC, donde una de las muestras presentó flavonoides, otra presentó chalconas, nueve presentaron triterpenos, una diterpenos y ninguna cumarina. Se prepararon diluciones utilizando como solvente DMSO al 10%, para poder determinar los ensayos microbiológicos frente a las cepas de *S. typhimurium*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *B. subtilis* y *Candida albicans*. Los ensayos microbiológicos llevados a cabo fueron difusión en agar, donde el extracto de Huizúcar presentó actividad antimicrobiana contra *S. typhimurium* y el de San Alejo contra *B. subtilis*. Además, se realizó CMI para los dos microorganismos sobre los cuales se encontró existencia de actividad antimicrobiana y se obtuvo una CMI de 2048 µg/mL y 4096µg/mL para *S. typhimurium* y *B. subtilis* respectivamente. Así mismo se realizó curva de muerte a partir de la CMI encontrada para los extractos con actividad antimicrobiana. Conjuntamente se realizó visualización al microscopio electrónico de barrido observándose deformación completa de las células microbianas. Investigación fue desarrollada en las instalaciones del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador y el Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) en el período de junio de 2019 a septiembre de 2020 y realizando la recolección de los propóleos en el período de mayo a septiembre de 2019.

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

1.0 INTRODUCCIÓN

Los propóleos son un producto natural y resinoso recolectado por las abejas *Apis mellifera* de exudaciones de árboles y plantas que luego pueden ser transformadas debido a la mezcla con las glándulas salivares de las abejas recolectoras, los cuales son utilizados por las abejas para la construcción reparación y protección de las colmenas, debido a sus propiedades mecánicas y actividades biológicas. Dichas actividades biológicas están ampliamente ligadas a la composición química, la cual, a su vez, depende de factores como la flora circundante, zona geográfica, climática y estación del año de recolección.

La presente investigación ha sido llevada a cabo con el propósito de evaluar la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos con muestras pertenecientes a la región, ya que existe poca información respecto a la composición química de propóleos de El Salvador y su relación con la actividad antimicrobiana.

En este estudio se estudiaron las diferentes características organolépticas estipuladas por la Norma Salvadoreña Obligatoria: Calidad de propóleo crudo NSO 65.19.02:03. Y así apreciar la variabilidad en ellas según la zona geográfica de nuestro país. Conjuntamente, se evaluó la presencia de metabolitos secundarios como triterpenos, diterpenos, flavonoides, chalconas y cumarinas en los extractos hidroalcohólicos preparados.

Adicional a esto, se evaluó su actividad antimicrobiana frente a diferentes microorganismos como *Escherichia coli* ATCC25922, *Pseudomona aeruginosa* ATCC9027, *Salmonella enterica serovar typhimurium* ATCC14028, *Bacillus subtilis subsp. spizizenii* ATCC6633, *Staphylococcus aureus* ATCC25923 y *Candida albicans* ATCC10231 mediante ensayo de difusión en agar lo cual permitió conocer cuáles de estos extractos presentaban actividad antimicrobiana

y poder determinar, en conjunto, su concentración mínima inhibitoria (CMI) por el método de microdilución en caldo y curva de muerte.

Al determinar la presencia de actividad antimicrobiana, se llevó a cabo visualizaciones en microscopía electrónica de barrido, que permitieran observar el posible daño celular causado por los extractos de propóleos sobre los microorganismos.

Dicha investigación fue desarrollada en las instalaciones del Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador y el Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) en el período de junio de 2019 a septiembre de 2020 y realizando la recolección de los propóleos en el período de mayo a septiembre de 2019.

CAPITULO II

OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* de extractos de propóleos de diferentes zonas de El Salvador.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 2.2.1 Describir características organolépticas como color, aspecto, olor, consistencia y sabor de las muestras de propóleos según la Norma Salvadoreña Obligatoria: Calidad de propóleo crudo NSO 65.19.02:03
- 2.2.2 Preparar extractos hidroalcohólicos de propóleos obtenidos de las muestras de las diferentes zonas geomorfológicas de El Salvador
- 2.2.3 Determinar el perfil cromatográfico de los extractos obtenidos mediante la identificación de triterpenos, chalconas, diterpenos, flavonoides y cumarinas por cromatografía en capa fina.
- 2.2.4 Demostrar la existencia de actividad antibacteriana *in vitro* de los extractos de propóleos frente a *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* mediante ensayos de difusión en agar, concentración mínima inhibitoria y curva de muerte.
- 2.2.5 Evidenciar el daño celular causado por los extractos de propóleos mediante microscopía electrónica de barrido.

CAPITULO III

MARCO TEÓRICO

3.0 MARCO TEÓRICO

3.1 Propóleos.

Los propóleos son una sustancia resinosa natural recolectada por las abejas *Apis mellifera*, a partir de las exudaciones de árboles y plantas. Estas sustancias pueden ser modificadas por la adición de secreciones salivares proporcionadas por las abejas. (76)

Estos constituyentes son biotransformados por la adición de cera y por acción de la enzima 1,3-glicosidasa, producida en las glándulas salivares de abejas. Las abejas depositan propóleos en las colmenas, donde tiene papel importante para cerrar rendijas, mantener la temperatura interna estable, recubrir el cuerpo de animales muertos dentro de la colmena y en la protección contra la proliferación de microorganismos. (6)

Las características morfológicas varían según la disponibilidad de las variedades vegetales y las condiciones ambientales. Por ello, su color puede variar del pardo rojizo al amarillo verdoso y oscurecerse hasta el negro dependiendo de su origen y la edad. Pero incluso propóleos transparentes han sido reportados. Posee un olor aromático característico agradable, y de sabor fuerte y picante. (64)

Los propóleos son un material lipofílico en su naturaleza, duro y quebradizo y se vuelve blando, flexible, gomoso y muy pegajoso cuando se calienta. (77)

3.2 Composición química de propóleos.

La composición exacta de los propóleos puros varía de acuerdo con la región, la planta proveedora de resina y la especie de abeja recolectora, reflejando la diversidad de actividades biológicas que este producto presenta. La constitución

química básica es una mezcla de ceras, resinas, bálsamos, aceites esenciales y polen. (5)

En general, se compone de 50 a 60% de resinas y bálsamos (flavonoides, ácidos fenólicos y ésteres); 30 a 40% de ceras (ácidos grasos de cadena larga); 5 a 10% de aceites esenciales (aceites volátiles); 5% de granos de polen (proteínas); microelementos y vitaminas. (61)

Se han identificado más de 300 componentes en diferentes muestras, hasta 150 en la fracción aromática, más de 100 compuestos para una misma muestra y todavía se están reconociendo nuevos durante la caracterización química de nuevos tipos de propóleos. Las proporciones de las diversas sustancias presentes en los propóleos dependen de su lugar y hora de recolección. (77)

Se han utilizado muchos métodos analíticos para la separación e identificación de los componentes de los propóleos y las sustancias identificadas pertenecen a los siguientes grupos de compuestos químicamente similares: polifenoles; ácidos benzoicos y derivados; alcohol cinámico y ácido cinámico y sus derivados; hidrocarburos sesquiterpénicos y triterpénicos; derivados de benzaldehído; otros ácidos y sus derivados; alcoholes, cetonas y compuestos heteroaromáticos; alcoholes terpénicos y sesquiterpénicos y sus derivados; hidrocarburos alifáticos; minerales; esteroides e hidrocarburos esteroideos; azúcares y aminoácidos. La composición cualitativa de los propóleos se describe en el cuadro N°1.

Los compuestos volátiles están presentes en bajas cantidades. Algunos compuestos son comunes en todas las muestras de propóleos y determinan sus propiedades características. (77)

Los propóleos de diferente origen contienen distintos componentes. Algunos

componentes están presentes en muchas muestras de diversos lugares. (77) El origen geográfico de la muestra de propóleos varía con su actividad biológica debido a las cambiantes condiciones climáticas. Los principales compuestos esenciales responsables de las actividades biológicas son los polifenoles, los ácidos aromáticos y los ácidos triterpénicos. La composición heterogénea también está relacionada con la flora específica de la región y los tratamientos de la materia prima. (77)

Cuadro N°1. Composición cualitativa principal de propóleos. (47)

Ácidos orgánicos	Acido benzoico, Acido gálico
Ácidos fenólicos	Ácido caféico, ácido ferúlico, ácido cinámico, ácido fenílico, ácido isofenílico ácido p-cumarínico.
Aldehídos aromáticos	Vainillina, isovainillina
Cumarinas	Esculetol, escopoletol.
Flavonas	Acacetina, crisina, pectolinarigenina, tectocrisina
Flavonoles	Galangina, izalquinina, kaempférido, quercetina, ramnocitrina.
Flavanonas	Pinostrobina, sakuranetina.
Dihidroflavononas	Pinobanksina.
Terpenoides	Limoneno, cimeno y estireno
Diterpenos	Totarol, ácido isocuprésico, ácido imbricatólico, manool.
Triterpenos	α - amirina, β - amirina, lupenol, lupenona.

3.3 Actividad biológica de propóleos.

Los propóleos han sido utilizados sistemáticamente en la medicina popular por

diferentes civilizaciones a lo largo de los siglos. Las características biológicas están directamente relacionadas con la composición química, que puede ser un problema debido a la variedad de condiciones, incluyendo la flora del lugar y época de recolección, la técnica de procesado, así como las especies de abejas.

(61)

Las ceras presentes en los propóleos no tienen actividad terapéutica probada, y constituyen alrededor del 30 a 40% del total de la muestra. El resto corresponde a la parte biológicamente activa. (64)

Las actividades biológicas para este producto natural incluyen actividad hepatoprotectora, antitumoral, inmunomoduladora, antifúngica, regenerativa, cicatrizante, anestésica, antioxidante y antimicrobiana. (5)

3.4 Actividad antimicrobiana de propóleos.

La actividad antimicrobiana de los propóleos está íntimamente relacionada a los compuestos químicos que lo constituyen, siendo atribuida a la presencia de compuestos flavonoides (galangina y pinocembrina), derivados de los ácidos benzoico, ferúlico y cafeico, ácidos fenólicos y sus ésteres, así como aldehídos fenólicos y cetonas. En el cuadro N° 2, se muestran diferentes microorganismos frente a los cuales se ha evidenciado actividad antimicrobiana. (45) (58) (77)

Fue una de las primeras propiedades constatadas. Múltiples estudios bacteriológicos tanto *in vitro* como *in vivo*, han confirmado la acción bacteriostática y bactericida que se le atribuye a los propóleos. Los propóleos son considerados una mezcla de grandes potencialidades para el tratamiento de afecciones provocadas por diferentes microorganismos en seres humanos y animales; atribuyéndosele propiedades farmacológicas tanto a nivel sistémico

como dermatológico. Extractos etanólicos de propóleos han mostrado una actividad bactericida frente a *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomona aeruginosa*, *Escherichia coli*. Los extractos etanólicos han mostrado una gran complejidad química, lo que sugiere la presencia de compuestos que están implicados en la inhibición de bacterias Gram positivas y Gram negativas. (50) (77)

Cuadro N°2. Microorganismos frente a los cuales se ha evidenciado actividad antimicrobiana de propóleos. (58)

Bioactividad	Comentarios	Actividad
Antimicrobiana	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Escherichia coli</i> O157:H7; <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Salmonella typhi</i> , <i>Salmonella thypimurium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Vibrio cholerae</i> y <i>Vibrio parahaemolyticus</i> <i>Campylobacter jejuni</i> , <i>Clostridium botulinum</i> , <i>Shigella</i> y <i>Yersinia enterocolitica</i> .	In vitro
Antifúngica	<i>Absidia corymbifera</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Aspergillus sulphureus</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Candida krusei</i> , <i>Candida tropicalis</i> , <i>Candida glabrata</i> , <i>C. kefir</i> , <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. famata</i> , <i>C. pelliculosa</i> , <i>Collectrichum gloeosporioides</i> , <i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Trichophyton mentagraphytes</i> , <i>Phytophthora capisisi</i> y <i>Phytophthora infestans</i> , <i>Phytophthora parasitica</i> y <i>P. ohmeri</i>	In vitro

La actividad frente a los microorganismos está más relacionada al efecto sinérgico de los flavonoides (y otros fenoles), que a la acción de cada uno de ellos por separado. Los mecanismos de acción antibacteriana utilizan varios mecanismos, como la formación de complejos estreptocócicos pseudo

multicelulares, desorganización del citoplasma, de la membrana plasmática y de la pared celular, bacteriólisis parcial, e inhibición de la síntesis de proteínas. Además, ha observado una inhibición de la división celular en presencia de propóleos y este hecho sugirió que los propóleos podrían actuar inhibiendo la replicación del ADN a través de la ARN polimerasa e indirectamente, afectando la división celular. El ácido cinámico y algunos flavonoides desactivan la energía de la membrana citoplasmática, inhibiendo la motilidad bacteriana, haciéndolas más vulnerables al ataque del sistema inmunológico y potenciando los antibióticos. (74)

3.5 *Staphylococcus aureus*

3.5.1 Generalidades

Desde su descubrimiento por el médico Alexander Ogston en 1880, *Staphylococcus aureus* es considerado un patógeno con gran potencial para causar múltiples infecciones en el humano y en los animales. *Staphylococcus aureus* es la especie tipo del grupo, considerada la más virulenta. Éste puede ser adquirido a través del contacto con otras personas o por exposición al ambiente. (82)

Estos microorganismos se encuentran en la piel y mucosas del ser humano. Originan una gran variedad de enfermedades que pueden poner en riesgo a la vida, como infecciones de la piel, en los tejidos blandos, los huesos y el aparato genitourinario. Pueden presentar resistencia a múltiples antibióticos en especial a los beta lactámicos y las penicilinas semisintéticas. (33)

3.5.2 Características morfológicas

El *Staphylococcus aureus* es un coco inmóvil, de 0.8 a 1 micrómetro de diámetro,

que se divide en tres planos para formar grupos de células irregulares semejantes a racimos de uvas. Los racimos irregulares son característicos de extendidos tomados de cultivos que se desarrollan en medios sólidos, mientras que en otros cultivos son frecuentes las formas de diplococos y en cadenas cortas. Unas pocas cepas producen una cápsula o capa de baba que incrementa la virulencia del microorganismo. El *Staphylococcus aureus* es un microorganismo Gram positivo pero las células viejas y los microorganismos fagocitados se tiñen como Gram negativos. Este microorganismo produce más de 95% de proteína A, la cual puede estar asociada al medio extracelular o la célula misma; la presencia de coagulasa o la proteína A es de gran importancia clínica para poder distinguir de las otras especies de *Staphylococcus*. (33)

Cuadro N°3. Clasificación taxonómica de *Staphylococcus aureus*. (82)

Dominio	Bacteria
Filo	Firmicutes
Clase	Bacilli
Orden	Bacillales
Familia	Staphylococcaceae
Dominio	Bacteria
Género	<i>Staphylococcus</i>
Especie	<i>Staphylococcus aureus</i>

3.5.3 Epidemiología

El hábitat humano básico de *Staphylococcus aureus* son las narinas anteriores. Entre 10 y 30% de la población porta este organismo en dicha localización en cualquier momento dado, y las tasas entre pacientes y profesionales en

hospitales pueden ser mucho mayores. A partir del sitio nasal, las bacterias se eliminan hacia la piel expuesta y la ropa del portador y de las demás personas con las que entra en contacto. La propagación se aumenta al tocarse la cara y, por supuesto, al picarse la nariz. Se bloquea mediante el lavado de manos. Una vez que se encuentra presente en la piel, aun de manera transitoria, *Staphylococcus aureus* puede obtener un acceso más profundo ya sea a través de las faneras o por traumatismo. Aunque las investigaciones epidemiológicas muestran que algunas cepas tienen una virulencia potenciada, aún no existen pruebas de laboratorio que puedan separarlas de la amplia reserva de individuos colonizados. (62)

La mayoría de las infecciones por *Staphylococcus aureus* adquiridas en la comunidad son autoinfecciones con cepas que el individuo ha estado transportando en las narinas anteriores, en la piel, o ambas. Por lo general, los brotes comunitarios se asocian con una higiene deficiente y la transmisión por fómites de individuo a individuo. A diferencia de muchos organismos vegetativos patogénicos, *Staphylococcus aureus* puede sobrevivir periodos de secado; por ejemplo, las infecciones cutáneas recurrentes pueden ser el resultado de ropa contaminada con pus de una infección anterior. (62)

La intoxicación alimenticia por *Staphylococcus* es una de las enfermedades transportadas por alimentos de mayor frecuencia en el mundo. La comida se contamina por un cocinero portador nasal o que tiene una lesión estafilocócica. Si la comida no se refrigera durante horas entre su preparación y el momento en que se sirve, los *Staphylococcus* tienen la oportunidad de multiplicarse y producir enterotoxinas dentro de los alimentos. Debido a su resistencia al calor, la toxicidad persiste incluso si la comida vuelve a cocinarse antes de comerse. (62)

En los últimos años han aumentado de forma notable las infecciones por este

microorganismo, en especial por cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina. El Centro de Enfermedades Infecciosas estima que en EUA en el año 2005 se desarrollaron 94,360 infecciones invasivas por *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina. Sin embargo, en los últimos años se ha observado un incremento progresivo de infecciones producidas por cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina, con una sensibilidad a los antibióticos diferente que afecta a la población sana sin haber tenido contacto previo con los hospitales o clínicas de salud. Los estudios de epidemiología molecular son de gran importancia ya que nos han permitido entender las relaciones evolutivas entre las cepas, así como conocer el origen de las clonas durante los brotes epidémicos. ⁽⁸²⁾

3.5.4 Tratamiento

La mayoría de los furúnculos y abscesos estafilocócicos superficiales se resuelven de manera espontánea sin terapias antimicrobianas. Aquellos más extensos, profundos o en órganos vitales requieren de una combinación de drenado quirúrgico y antimicrobianos para un desenlace óptimo.

Las penicilinas y cefalosporinas son activas en contra de peptidoglucanos de la pared de *Staphylococcus aureus* y varían en su susceptibilidad de inactivación por betalactamasas estafilocócicas. Aunque la penicilina G es el tratamiento de elección para las cepas susceptibles, las penicilinas resistentes a la penicilinas (metecilina, nafcilina, oxacilina) y las cefalosporinas de primera generación se utilizan más comúnmente debido a la elevada resistencia a la penicilina (más de 80%).

Para las cepas SARM resistentes a estos medicamentos o en pacientes con hipersensibilidad a los betalactámicos, las alternativas son vancomicina,

clindamicina o eritromicina. La sinergia entre antibióticos que afectan la pared celular y los aminoglucósidos se encuentra presente cuando el *Staphylococcus* es sensible a ambos tipos de sustancias. Estas combinaciones se utilizan con frecuencia en infecciones sistémicas extremas donde se necesita una acción bactericida efectiva y rápida, en particular en hospedadores comprometidos. (62)

3.6 *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*

3.6.1 Generalidades

Bacillus subtilis subsp. *spizizenii*, llamado así por el bacteriólogo estadounidense J. Spizizen, cuyos estudios de *Bacillus subtilis* hicieron de esta especie un organismo modelo de genética bacteriana. (38)

Cuadro N°4. Clasificación taxonómica de *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*. (44)

Dominio	Bacteria
Filo	Firmicutes
Clase	Bacilli
Orden	Bacillales
Familia	Bacillaceae
Género	<i>Bacillus</i>
Especie	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>Spizizenii</i>

3.6.2 Características morfológicas

Las características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas son las mismas que las de *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*, aunque existe una diferencia fenotípica entre las subespecies en sus constituyentes de la pared celular. (16) Bacilos

móviles, que miden de 0 a 5 μm por 2 a 3 μm y se presentan solas o en cadenas cortas. Las esporas cilíndricas se forman central o paracentralmente en esporangios no inflamados. Estrictamente aeróbico. Catalasa positiva. El crecimiento ocurre de 15-20°C a 45-55°C. La temperatura óptima de crecimiento oscila entre 28 a 30°C. Crece en NaCl al 7% y a un pH de 5.6. El crecimiento en presencia de 0.001% lisozima es variable. Produce acetilmetilcarbinol (prueba Voges Proskauer); Indol no se produce. Hidroliza almidón y caseína; la tirosina y la fenilalanina no se descomponen. El nitrato se reduce a nitrito; utiliza citrato; D-Glucosa, D-xilosa, L-arabinosa, manitol y trehalosa se fermentan. El ribitol es un componente principal de la pared celular. (44)

3.6.3 Epidemiología

Aunque *Bacillus* es un microorganismo inofensivo, puede causar infecciones en los ojos, tejidos blandos, pulmón y sangre. Por lo general, las infecciones se asocian con inmunosupresión, traumatismo, catéteres permanentes o contaminación de equipos complejos. (44)

3.6.4 Tratamiento

Se han ensayado diferentes antibióticos sobre las cepas como la capreomicina, clortetraciclina, dihidrostreptomina y paronomina. (44)

3.7 *Escherichia coli*.

3.7.1 Generalidades

La familia Enterobacteriaceae constituye un grupo grande y heterogéneo de bacterias Gram negativas. Reciben su nombre por la localización habitual como saprófitos en el tubo digestivo, aunque se trata de gérmenes ubicuos,

encontrándose de forma universal en el suelo, el agua y la vegetación, así como formando parte de la microbiota intestinal normal de muchos animales además del hombre. *Escherichia coli*, el microorganismo más prevalente de esta familia es una de las bacterias prototípicas sometidas a estudio. *Escherichia coli* es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo de la familia Enterobacteriaceae, género *Escherichia*. Esta bacteria coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento y se le considera un microorganismo de microbiota normal, pero hay cepas que pueden ser patógenas y causar daño produciendo diferentes cuadros clínicos, entre ellos diarrea. (82)

Cuadro N°5. Clasificación taxonómica de *Escherichia coli*. (82)

Reino	Bacteria
Filo	Proteobacteria
Clase	Gammaproteobacteria
Orden	Enterobacteriales
Familia	Enterobacteriaceae
Género	<i>Escherichia</i>
Especie	<i>Escherichia coli</i>

3.7.2 Características morfológicas

Escherichia coli es un bacilo entérico Gram negativo no esporulado móvil por flagelación peritrica, aerobio facultativo, oxidasa negativa, con requerimientos nutritivos muy sencillos, fermentadores de azúcares que puede crecer como azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos. (82)

Como integrante de la microbiota normal del hombre y de muchos animales, se

lo considera un germen indicador de contaminación fecal cuando está presente en el ambiente, agua y alimentos, junto con otros similares agrupados bajo la denominación de bacterias coliformes. (82)

El metabolismo de *Escherichia coli* consiste en utilizar azúcares sencillos y requiere nitrógeno soluble, son oxidasa negativos y catalasa positivos, en general indol positivos y descarboxilan la lisina, ureasa negativa e incapaz de crecer en medio con citrato como única fuente de carbono y energía, pero sí en caldo acetato.

Se clasifican en más de 170 serogrupos O adaptados a diferentes ambientes, incluso dentro del huésped llegando a ser un patógeno mortal, es por ello que su diagnóstico oportuno y su combate con el uso apropiado de antibióticos resultan de suma importancia para disminuir la incidencia. (82)

3.7.3 Epidemiología

Escherichia coli causa más de 90% de los más de 7 millones de casos de cistitis y de los más de 250,000 casos de pielonefritis que se espera ocurran cada año en EUA en individuos por lo demás sanos. Las infecciones en las vías urinarias son mucho más frecuentes en mujeres y 40% de ellas tienen un episodio a lo largo de la vida, por lo común cuando tienen vida sexual activa. (62)

El reservorio para estas infecciones es la microbiota intestinal de *Escherichia coli* del propio paciente, la cual contamina la región perineal y uretral. En individuos con obstrucción o instrumentación de las vías urinarias, las fuentes de contaminación ambiental adquieren cierta importancia. (62)

Escherichia coli es la causa más común de meningitis neonatal (siendo una

infección oportunista); muchas características de este trastorno son similares a las que se observan en la enfermedad por *Streptococcus* del grupo B. Casi 75% de los casos son causados por cepas que poseen un polisacárido capsular K1 que contiene ácido siálico y que es idéntico desde el punto de vista estructural al polisacárido del grupo B de *Neisseria meningitidis*, otra bacteria que causa meningitis. Con excepción de las infecciones de vías urinarias, son poco comunes las infecciones extraintestinales por *Escherichia coli* a menos que exista una alteración significativa en las defensas del hospedador. (62)

La diarrea es una manifestación clínica universal con cepas de *Escherichia coli* capaces de causar enfermedad intestinal. La naturaleza de la diarrea varía según el mecanismo patógeno. Las cepas enterotoxigénicas (ETEC) y enteropatógena (EPEC) producen diarrea acuosa; las cepas enterohemorrágicas (EHEC) producen diarrea sanguinolenta y las cepas enteroinvasoras (EIEC) pueden causar disentería con presencia de sangre y pus en heces. La diarrea suele ceder de manera espontánea después de 1 a 3 días. Las cepas enteroagregativa (EAEC) se asocian con diarrea acuosa prolongada (más de 14 días), en ocasiones con sangre y moco. Las cepas enterohemorrágicas de *Escherichia coli* son la excepción, pues pueden producir manifestaciones clínicas extraintestinales que pongan en riesgo la vida del hospedador y que están relacionadas con la producción de toxina Shiga. (62)

3.7.4 Tratamiento.

La infección de vía urinaria aguda no complicada a menudo se trata de manera empírica. Por la amplia resistencia a los antibióticos utilizados antes como ampicilina, hoy en día se utilizan trimetoprim-sulfametoxazol (TMP-SMX) o fluoroquinolonas. La selección de otros antimicrobianos debe guiarse con base en la susceptibilidad antimicrobiana de los aislados del paciente. (62)

La mayor parte de las diarreas por *Escherichia coli* son leves y ceden en forma espontánea y, por tanto, el tratamiento no suele ser un problema. Cuando esto ocurre, la rehidratación y las medidas de sostén son la base del tratamiento, sin importar el agente causal. En el caso de las cepas enterohemorrágicas (EHEC) con colitis hemorrágica y HUS, (Síndrome Urémico Hemolítico) pueden ser necesarias las medidas de sostén intensivas como hemodiálisis o hemoféresis.

El tratamiento con trimetoprim-sulfametoxazol (TMP-SMX) o fluoroquinolonas reduce la duración de la diarrea en infecciones por ETEC, EIEC y EPEC. Puede incrementarse el riesgo de HUS (Síndrome Urémico Hemolítico) con el uso de antimicrobianos, por tanto, está contraindicado su uso cuando se sospeche de cepas enterohemorrágicas (EHEC). Los fármacos que antagonizan la motilidad intestinal no son de utilidad y están contraindicados cuando el agente causal podría ser EIEC o EHEC. (62)

3.8 *Pseudomonas aeruginosa*

3.8.1 Generalidades

Este tipo de microorganismo patógeno se caracteriza por ser por lo general un agente de infección hospitalaria a través de dispositivos invasivos y medios externos, las infecciones hospitalarias (IH) se definen como “una infección que se presenta en un paciente internado en un hospital o en otro establecimiento de atención de salud en quien la infección no se había manifestado ni estaba en período de incubación en el momento del internamiento. Incluyen también las infecciones contraídas en el hospital, pero manifiestas después del alta hospitalaria y también las infecciones ocupacionales del personal del establecimiento”, constituyen un serio problema de salud tanto por su difícil manejo (muchos de los patógenos implicados son resistentes a varios antibióticos). (79)

Cuadro N°6. Clasificación taxonómica de *Pseudomonas aeruginosa*. (82)

Reino	Bacteria
Filo	Proteobacteria
Clase	Gammaproteobacteria
Orden	Pseudomonadales
Familia	Pseudomonadaceae
Género	<i>Pseudomonas</i>
Especie	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>

3.8.2 Características morfológicas

Pseudomonas aeruginosa es un bacilo aerobio, móvil, Gram negativo que es más delgado y pálido a la tinción que otras Enterobacterias. Su característica bacteriológica más notable es la producción de pigmentos hidrosolubles de color. *Pseudomonas aeruginosa* también muestra resistencia a los antimicrobianos de manera más consistente que todas las demás bacterias de importancia médica.

(62)

Pseudomonas aeruginosa, su morfología colonial es característica de identificación en algunos medios de cultivo, por ejemplo, en medio agar Cetrimide; es un bacilo curvo o recto, aislado, en pareja o cadenas cortas; esta bacteria tiene motilidad positiva gracias a su flagelo (sólo cuenta con uno). (79)

Tiene la capacidad de formar biofilm, tiene un ligero aroma a frutas y es una de las principales bacterias oportunistas causantes de infecciones nosocomiales, especialmente en heridas, quemaduras y cuando se presentan cepas mucoides

hay una alta mortalidad en casos de fibrosis quística. (79)

3.8.3 Epidemiología

El hábitat primario de *Pseudomonas aeruginosa* es el medio ambiente. Se encuentra en agua, tierra y diversos tipos de vegetación en todo el mundo. *Pseudomonas aeruginosa* se ha aislado de faringe y heces en 2 a 10% de las personas sanas. Las tasas de colonización son mucho más elevadas en individuos hospitalizados. La infección con *Pseudomonas aeruginosa* es poco común en personas previamente sanas y es una de las causas más importantes de infección invasora en pacientes hospitalizados con enfermedades subyacentes graves como leucemia, fibrosis quística y quemaduras extensas. (62)

La capacidad de *Pseudomonas aeruginosa* para sobrevivir y proliferar en agua con escasos nutrientes puede conducir a una gran contaminación de líquidos no estériles, como en ciertos humidificadores de respiradores mecánicos. La inhalación de aerosoles de tales orígenes puede evitar los mecanismos de defensa normales del aparato respiratorio e iniciar una infección pulmonar. Las infecciones han sido consecuencia de la proliferación de *Pseudomonas* en medicamentos, solución de lentes de contacto e incluso en algunos desinfectantes. Los fregaderos y grifos pueden estar muy contaminados y actuar como fuente ambiental para la contaminación de otros objetos. (62)

Pseudomonas aeruginosa es el patógeno bacteriano más común que complica el tratamiento de pacientes con fibrosis quística, trastorno hereditario en el transporte de iones cloruro que ocasiona la producción de moco viscoso en los conductos y en el árbol traqueobronquial. En un alto porcentaje de los casos, el aparato respiratorio es colonizado con *Pseudomonas aeruginosa*, que una vez que se ha establecido, es prácticamente imposible de erradicar. Esta infección

es la principal causa de morbilidad y mortalidad en estos pacientes. (62)

3.8.4 Tratamiento

De las bacterias patógenas, *Pseudomonas aeruginosa* es el microorganismo que de manera más consistente es resistente a diversos antibióticos. Esto se debe principalmente a las porinas que restringen su entrada al espacio periplásmico. Las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* por lo común son resistentes a penicilina, ampicilina, cefalotina, tetraciclina, cloranfenicol, sulfonamidas y a los primeros aminoglucósidos (estreptomina, kanamicina). Se han dirigido grandes esfuerzos al desarrollo de antimicrobianos con actividad contra *Pseudomonas*. Los aminoglucósidos más nuevos (gentamicina, tobramicina, amikacina) muestran actividad contra la mayor parte de las cepas pese a la presencia de resistencia mediada por plásmidos y por mutaciones. (62)

La carbenicilina y ticarcilina presentan actividad y pueden administrarse en dosis elevadas, pero las mutaciones de permeabilidad ocurren más a menudo que con los aminoglucósidos. La característica más notable de algunas de las cefalosporinas de tercera generación (ceftazidima, cefepima, cefoperazona), carbapenémicos (imipenem, meropenem) y monobactámicos (aztreonam) radica en su actividad contra *Pseudomonas*. En términos generales, las infecciones urinarias pueden tratarse con dosis única, pero las infecciones sistémicas más graves por *Pseudomonas aeruginosa* por lo común se tratan con una combinación de beta lactámicos con actividad contra *Pseudomonas* y un aminoglucósido, en particular en individuos con neutropenia. También se ha utilizado ciprofloxacina en el tratamiento de tales casos. En todas las instancias, la susceptibilidad debe confirmarse por medio de pruebas *in vitro*. (62)

El tratamiento de la infección por *Pseudomonas aeruginosa* en pacientes con

fibrosis quística constituye un problema especial, porque la mayor parte de los antimicrobianos eficaces se administran sólo por vía intravenosa. Hay renuencia para hospitalizar a muchos pacientes, por lo que suele utilizarse tratamiento oral. Hay poca experiencia con respecto a su eficacia bajo estas condiciones, y la naturaleza crónica de la fibrosis quística es un inconveniente por el desarrollo de resistencia durante el tratamiento. Ya se han observado resistencias con ciprofloxacina y aztreonam. La tobramicina en aerosol también es utilizada en algunos pacientes con fibrosis quística, con cierta evidencia de mejoría clínica.

(62)

3.9 *Salmonella entérica serovar typhimurium*

3.9.1 Generalidades

Casi todos los organismos de *Salmonella* que causan enfermedad en humanos y animales domésticos pertenecen a *Salmonella entérica subespecie entérica*. Las cepas de *Salmonella entérica* se pueden clasificar sobre la base del antígeno de superficie O (lipopolisacárido [LPS]) en 67 serogrupos y en 2,557 serotipos o serovares cuando las cepas se diferencian por sus antígenos O y H (flagelar). Hoy en día, de acuerdo con la clasificación actual, los nombres familiares dados a los serovares, como *Salmonella entérica serovar typhimurium*, *enteritidis* o *choleraesuis*, se mantienen y no se reemplazan por sus fórmulas antigénicas. (21)

Salmonella entérica serovar typhimurium (*Salmonella typhimurium*) es un patógeno entérico primario que infecta a humanos y animales. Es una de las principales causas de gastroenteritis aguda, que se caracteriza por diarrea inflamatoria. Aunque el intestino normal está en gran parte habitado por microbios comensales, que incluyen en gran medida Bacteroides y Firmicutes, la inflamación aumenta la colonización de *Salmonella typhimurium* y otras Enterobacteriaceae. La infección comienza con la ingestión de alimentos o agua

contaminados para que la *Salmonella* llegue al epitelio intestinal y desencadenen enfermedades gastrointestinales. (20) (21)

Estudios recientes han demostrado que *Salmonella typhimurium* prospera en el intestino inflamado porque puede utilizar fuentes únicas de carbono y energía y es resistente a las proteínas antimicrobianas que son secretadas por el huésped como parte de la respuesta inmune nutricional. (20)

Cuadro N°7. Clasificación taxonómica de *Salmonella typhimurium*. (20) (21)

Dominio	Bacteria
Filo	Proteobacteria
Clase	Gammaproteobacteria
Orden	Enterobacteriales
Familia	Enterobacteriaceae
Género	<i>Salmonella</i>
Especie	<i>Salmonella typhimurium</i>

3.9.2 Características morfológicas.

El género *Salmonella* es una bacteria Gram negativa, no formadora de esporas y con forma de bastón que pertenece a la familia Enterobacteriaceae. El tamaño varía de 2 a 5µm de longitud de 0.4 a 1.5µm de diámetro. Son anaerobios facultativos y muestran motilidad peritrica. Fermentan la glucosa con ácido y algunas veces con gas, y la mayoría de ellos producen H₂S, pero no ureasa. No son fastidiosos, crecen fácilmente en la mayoría de los medios de laboratorio y pueden sobrevivir fuera del huésped en entornos inhóspitos como el agua dulce y las temperaturas de congelación. Estos son patógenos intracelulares que

conducen a diferentes manifestaciones clínicas en humanos y animales. (67)

3.9.3 Epidemiología.

Según los datos obtenidos de la Organización Mundial de la Salud, *Salmonella enteritidis* y *Salmonella typhimurium* son los dos serotipos aislados con mayor frecuencia en la práctica clínica. *Salmonella entérica serovar typhimurium* es un patógeno bacteriano intracelular facultativo que causa gastroenteritis leve a severa. Los CDC (Centros de Control de Enfermedades, por sus siglas en inglés), han estimado que la *Salmonella* es responsable de 1 a 4 millones de enfermedades anuales, lo que resulta en más de 16000 hospitalizaciones y casi 600 muertes solo en los Estados Unidos. El Servicio de Seguridad e Inspección de Alimentos (FSIS) ha declarado que la *Salmonella* es la causa más común de enfermedades transmitidas por alimentos entre los patógenos entéricos. (21) (68)

La salmonelosis no tifoidea es la principal causa de infecciones transmitidas por alimentos en los Estados Unidos. La mayoría de los casos de salmonelosis están asociados con el consumo de productos alimenticios contaminados como carne de res, cerdo, carne de aves, huevos y productos frescos. La cocción inadecuada de los alimentos listos para el consumo agrava aún más los brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos. Los alimentos que pueden haber sufrido un abuso de temperatura podrían causar que las células de *Salmonella* sobrevivientes sean más resistentes a otras condiciones de estrés y aumenten su virulencia. Estudios anteriores han demostrado que la temperatura es un factor que controla la expresión del gen de virulencia en bacterias involucradas en la colonización del huésped mamífero. (68)

3.9.4 Tratamiento.

El método terapéutico primario para la gastroenteritis por *Salmonella* consiste en

la reposición de líquidos y electrolitos y el control de náusea y vómito. ⁽²⁵⁾ En este tipo de enfermedad, los síntomas generalmente duran entre 5 y 7 días y se resuelven espontáneamente. ⁽³⁰⁾ No suele ser apropiada la antibioticoterapia porque tiende a incrementar la duración y frecuencia del estado de portador.

Cuando se utiliza para erradicar el estado de portador, los resultados suelen ser erráticos y por lo común fallan en presencia de afección concomitante de la vía biliar. Por tanto, el uso de antimicrobianos en gastroenteritis por *Salmonella entérica* se restringe a individuos con infecciones graves o factores de riesgo subyacentes, en particular en niños. En tales casos, los antimicrobianos se perciben como una medida para evitar la diseminación sistémica. ⁽⁶²⁾

Los antibióticos de uso común son fluoroquinolonas, trimetoprima-sulfametoxazol (TMP-SMZ), ampicilina o cefalosporinas de espectro expandido (por ejemplo, ceftriaxona o cefixima). ⁽³¹⁾ Sin embargo, las tasas crecientes de resistencia a los antibióticos entre los aislados de *Salmonella typhimurium* han llevado a un menor uso de trimetoprima-sulfametoxazol (TMP-SMZ) y ampicilina, ya que la resistencia a estos compuestos antimicrobianos es común. ⁽²⁰⁾ ⁽²¹⁾

Aislados de *Salmonella entérica serovar Typhimurium* de humanos, animales y ambientales han demostrado ser resistentes a ampicilina, cloranfenicol, estreptomina, sulfisoxazol y tetraciclina. ⁽⁶⁸⁾

El desarrollo de resistencia múltiple a los medicamentos se ha convertido en un fenómeno muy común entre los aislamientos, que se debe principalmente a la diseminación del clon de resistencia dominante o la diseminación de cepas que portan plásmidos resistentes a los medicamentos. Por lo tanto, el uso racional de antibióticos es muy importante para superar el problema del desarrollo de resistencia múltiple a medicamentos en *Salmonella*. ⁽⁶²⁾ ⁽⁶⁷⁾

3.10 Actividad antifúngica de propóleos.

La actividad antifúngica de los extractos de propóleos se observa por inhibición del crecimiento y proliferación en diferentes especies de levaduras como el complejo *Candida albicans* y *Candida glabrata*, acción posiblemente debida, al ácido cafeico, el P-cumarato de bencilo, la pinocambрина y la pinobanksina.

Entonces los propóleos puede vislumbrarse como potencial tratamiento contra las infecciones por hongos, tanto levaduriformes como filamentosos sobre la base del constante aumento de la prevalencia de las micosis, del desarrollo de resistencia a agentes antimicóticos actuales, de los efectos adversos que poseen estos antimicóticos y porque la terapia con propóleos resulta económica y poco tóxica (dosis diarias de 1.400 mg/kg no ocasiona efectos adversos en ratones, aunque el consumo bruto en el hombre puede generar náuseas), de allí la necesidad de realizar ensayos sobre su efecto antimicótico y también porque la composición química del propóleos aunque similar puede presentar pequeñas variaciones en distintas regiones del mundo que requieren ser precisadas. La actividad biológica del extracto etanólico de propóleos sobre *Candida spp.* ha sido demostrada en diferentes regiones geográficas como Egipto, Turquía, Bulgaria, Brasil, El Salvador y Cuba. (29)

Los propóleos centroeuropeos (Alemania, Francia y Austria), con composiciones cualitativas similares y predominio del ácido trans-p-cumárico, muestran actividad frente a *Candida albicans*, mientras que los mediterráneos (Bulgaria, Turquía, Grecia y Argelia), que contienen flavonoides, ésteres del ácido cafeico y ácidos ferúlicos, presenta menor actividad antifúngica.

Por su parte, los propóleos egipcios de Dakahlia, con dos ésteres de cafeato y dos triterpenoides, es más activo frente a *Candida albicans* que el de Ismailia que

no contiene ácidos aromáticos, ni ésteres, ni flavonoides y, estudios sobre la incidencia de la paracoccidiomicosis en América latina, sugieren que, independientemente de su origen geográfico, los macrófagos estimulados con propóleos aumentan su actividad fungicida. (74)

3.11 Candida

3.11.1 Generalidades

Los hongos del género *Candida* por lo común crecen como levaduras redondeadas, ovals o con forma de yema de 4 a 6 μm bajo la mayor parte de las condiciones y temperaturas. En ciertas condiciones, incluidas aquellas que se encuentran en la infección, pueden formar hifas en cultivo. La identificación de los hongos del género *Candida* se basa en la combinación de características bioquímicas, enzimáticas y morfológicas, por ejemplo, la asimilación de carbohidratos, capacidad de fermentación y la capacidad de producir hifas, tubos germinales y clamidoconidias.

De las más de 150 especies del género *Candida*, menos de 10 aparecen como causa de enfermedad en humanos. Debe prestarse particular atención a la diferencia de *Candida albicans* de otras especies, porque con mucho es la causa más común de enfermedad. (62)

3.11.2 *Candida albicans*

Es una levadura extremadamente extendida, es la principal causa de candidiasis (también llamada candidiasis o moniliasis). Las infecciones oportunistas más comunes son causadas por la levadura *Candida albicans* que van desde irritaciones cutáneas superficiales de corta duración hasta enfermedades sistémicas fatales. Es un microorganismo que se encuentra de manera normal

en la microbiota gastrointestinal y genital. (62)

Cuadro No. 8. Clasificación taxonómica de *Candida albicans*. (38)

Dominio	Eucarya
Reino	Fungi
División	Eumycota
Subdivisión	Deuteromycotina
Clase	Blastomycetes
Familia	Cryptococaceae
Género	<i>Candida</i>
Especie	<i>Candida albicans</i>

3.11.2.1 Características morfológicas

Candida albicans crece con diversas morfologías, más a menudo como levadura con gemación mediante la formación de blastoconidias. *Candida albicans* también es capaz de formar hifas, lo que es estimulado por cambios en condiciones como la temperatura, pH y nutrientes disponibles.

Cuando se observa en sus etapas iniciales aún unida a la célula de la levadura, estas hifas tienen el aspecto de retoños y se denominan tubos germinales. Otras formas elongadas con restricciones a intervalos se denominan pseudohifas porque carecen de paredes paralelas y de la tabicación que se observa en las hifas verdaderas. Hay evidencia de que estas tres formas tienen un estímulo y regulación genéticas diferentes, lo que hace de *Candida albicans* un hongo polimórfico.

A menos que se especifique lo contrario, el término hifas se utiliza para referirse a las hifas verdaderas y pseudohifas. Bajo ciertas condiciones las hifas también desarrollan una clamidoconidia terminal característica, con engrosamiento de la pared. Macroscópicamente, es una colonia pastosa de color blanco a crema con un olor a levadura. (62)

La mayor parte de los hongos del género *Candida* crecen con rapidez en agar de Sabouraud y en medios bacteriológicos enriquecidos, como agar sangre. En agar sangre, después de una noche de incubación se producen colonias lisas, blanquecinas, de 2 a 4 mm, similares a las producidas por *Staphylococcus*. La aireación de los cultivos favorece su aislamiento. (62)

3.11.2.2 Epidemiología

Candida albicans en condiciones normales es parte de la microbiota orofaríngea, gastrointestinal y del aparato reproductor femenino. Las infecciones son endógenas excepto en casos de contacto directo de la mucosa con lesiones de otras personas (por ejemplo, contacto sexual).

Candida albicans es una causa común de infecciones nosocomiales, pero los hongos con frecuencia se derivan de la propia microbiota del paciente más que de infecciones cruzadas. Los procedimientos con penetración corporal y los dispositivos a permanencia pueden actuar como sitio de entrada para la infección y el número de microorganismos de *Candida* disponibles puede incrementarse con el uso de fármacos antibacterianos. (62)

3.11.2.3 Tratamiento

Candida albicans por lo común es susceptible a la anfotericina B, nistatina,

flucitosina, caspofungina y compuestos azólicos. Las infecciones superficiales por lo común se tratan con compuestos azólicos o nistatina tópica. Las medidas para disminuir la humedad y el traumatismo crónico son auxiliares importantes en el tratamiento de las infecciones cutáneas por *Candida*. Las infecciones profundas por *Candida albicans* pueden ceder en forma espontánea al eliminar o controlar los factores predisponentes. (62)

El retiro de un catéter infectado, el control de la diabetes o el incremento en el recuento de leucocitos en sangre periférica a menudo se asocian con la recuperación sin tratamiento antimicótico. Las recaídas persistentes o la candidiasis diseminada se tratan con diversas combinaciones de fluconazol, anfotericina B y caspofungina. El fluconazol ha sido el tratamiento más eficaz para la candidiasis mucocutánea crónica. (62)

3.12 Susceptibilidad de microorganismos

La capacidad para dirigir el tratamiento en forma específica a un agente infeccioso productor de enfermedad es única del manejo de las enfermedades infecciosas. Su éxito inicial depende de explotar las diferencias entre nuestra propia constitución y metabolismo y las de los microorganismos en cuestión. El éxito continuo de las sustancias antibacterianas depende de si los organismos a los que se dirigió originalmente el fármaco han desarrollado resistencia. (62)

Todas las sustancias antimicrobianas eficaces en un sentido clínico exhiben una toxicidad selectiva contra el parásito en lugar de contra el hospedador, característica que las diferencia de la mayoría de los desinfectantes. En la mayoría de los casos, la toxicidad selectiva se explica por medio de la acción sobre los procesos o estructuras microbianos que difieren de aquellos de las células mamíferas. (62)

El espectro de actividad de cada sustancia antimicrobiana describe los géneros y especies contra los cuales es típicamente activa. Los espectros se superponen, pero en general son característicos para cada clase amplia de antimicrobianos.

Algunos antimicrobianos antibacterianos se conocen como sustancias de espectro estrecho, que por ejemplo pueden ser activos contra muchos cocos Gram positivos y Gram negativos, pero tiene poca actividad contra los bacilos Gram negativos entéricos. Por otra parte, los agentes de amplio espectro inhiben un amplio rango de bacterias Gram positivas y Gram negativas, incluyendo algunos organismos intracelulares obligados. (62)

La decisión sobre si cualquier bacteria se debe considerar susceptible o resistente a cualquier antimicrobiano implica una evaluación integrada de actividad *in vitro*, características farmacológicas y evaluación clínica. (62)

Cualquier sustancia aprobada para uso clínico ha demostrado *in vitro* su potencial para inhibir el crecimiento de algún grupo blanco de bacterias a concentraciones que pueden lograrse con riesgos de toxicidad aceptables. (62)

Un aspecto único de las pruebas de laboratorio en microbiología es que es posible examinar la susceptibilidad del aislado de un paciente particular contra una batería de sustancias antimicrobianas potenciales.

Estas pruebas se crean alrededor del tema común de colocar al organismo en presencia de diversas concentraciones del antimicrobiano a fin de determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI).

En la figura N°1 se presentan algunos microorganismos y sus susceptibilidades y resistencia frente a antimicrobianos. (62)

3.13 Metodologías utilizadas para la extracción de compuestos de propóleos.

Considerando la compleja estructura de propóleos, no se puede usar directamente. Los solventes más comunes utilizados para la extracción son agua, metanol, etanol, cloroformo, diclorometano, éter y acetona. Muchos de los componentes bactericidas son solubles en agua o alcohol, lo que debería eliminar el material inerte y preservar los compuestos deseados. La composición del propóleos depende de la región geográfica y, en segundo lugar, del método de extracción, por lo tanto, el disolvente debe elegirse cuidadosamente. ⁽⁷⁷⁾

Los factores que influyen sobre la velocidad de extracción se relacionan con el tamaño de las partículas sólidas. Evidentemente cuanto más pequeñas sean, mayor es la superficie interfacial y más corta la longitud de los poros. Por tanto, mayor es la velocidad de transferencia. Esto se puede lograr triturando el sólido a extraer. Sin embargo, tamaños excesivamente pequeños pueden hacer que las partículas se apelmacen dificultando la extracción; el tipo y polaridad del disolvente es también una condición que incide en el rendimiento de la extracción. El disolvente debe ser lo más selectivo posible y se recomienda de baja viscosidad. ⁽⁶⁵⁾

Los principales metabolitos de las plantas, también presentes en propóleos que han demostrado actividad bacteriostática y bactericida, exhiben una marcada solubilidad en agua o alcohol. Diversas estrategias han sido adoptadas en la determinación de compuestos orgánicos en productos naturales y en particular en los flavonoides presentes en extractos de propóleos, que van desde la extracción líquido/líquido (L/L); extracción con disolventes (ES); extracción en fase sólida de la matriz (EFMS); micro extracción en fase sólida (MEFS), (figura N°2) con el fin de para dar paso al proceso de cuantificación. ⁽⁶³⁾

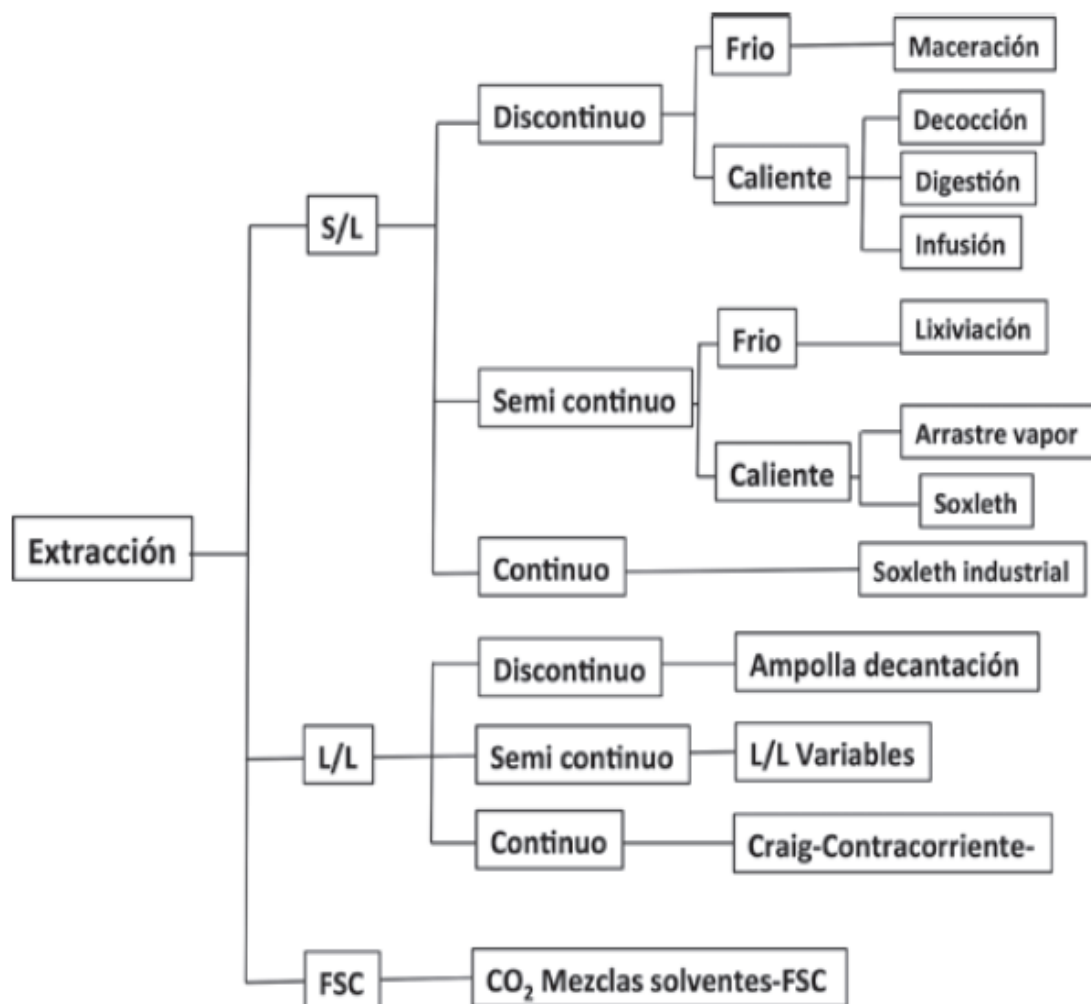


Figura N°2. Métodos singulares de extracción de principios activos en productos naturales. S/L: Sólido/Líquido. L/L: Líquido/Líquido. FSC: Fluido supercrítico. (63)

3.13.1 Extracción por maceración.

El proceso clásico de maceración consiste en dejar la droga en contacto con el solvente durante varios días, con agitación ocasional. Se trata de un proceso que da como resultado un equilibrio de concentración entre la droga y el solvente, y depende de factores que están unidos a la droga, como, por ejemplo, su naturaleza, el tamaño de partícula y factores que están relacionados con el

solvente. Es un proceso bastante utilizado para las preparaciones en pequeña escala. (65)

3.14 Métodos para la determinación cualitativa de metabolitos secundarios.

3.14.1 Métodos cromatográficos.

La cromatografía consiste en un método por el cual se da la separación de los componentes de una mezcla debido a la diferente velocidad de elución a través de una fase estacionaria cuando la mezcla es transportada por una fase móvil.

(26)

La cromatografía es una técnica que permite la separación de los componentes de una mezcla, debido a la influencia de dos efectos contrapuestos:

- Retención: efecto ejercido sobre los componentes de la mezcla por una fase estacionaria, que puede ser un sólido o un líquido anclado a un soporte sólido.
- Desplazamiento: efecto ejercido sobre los componentes de la mezcla por una fase móvil, que puede ser un líquido o un gas. (26)

La mezcla por separar se deposita sobre la fase estacionaria y la móvil atraviesa el sistema desplazando a los componentes de la mezcla a distintas velocidades, dependiendo de la magnitud de sus interacciones relativas con ambas fases. La repetición sucesiva de las operaciones elementales de retención y desplazamiento a lo largo del sistema cromatográfico da lugar a la separación de la mezcla original. La cromatografía se emplea para conocer y separar los componentes por diferencia de polaridad de una mezcla y su identificación respectiva. (26)

3.14.1.1 Cromatografía en capa fina (TLC).

La cromatografía en capa fina se basa en la preparación de una capa, uniforme, de un absorbente mantenido sobre una placa, la cual puede ser de vidrio, aluminio u otro soporte. Los requisitos son un adsorbente, placas, un dispositivo que mantenga las placas durante la extensión, otro para aplicar la capa de adsorbente, y una cámara en la que se desarrollen las placas cubiertas. (26)

La fase móvil es líquida y la fase estacionaria consiste en un sólido. La fase estacionaria será un componente polar y el eluyente será por lo general menos polar que la fase estacionaria, de forma que los componentes que se desplacen con mayor velocidad serán los menos polares. La mezcla por analizar se deposita a una pequeña distancia del borde inferior de la placa y se introduce en una cubeta que contiene la fase móvil (eluyente), la cual asciende a lo largo de la placa por capilaridad, desplazando a los componentes de la mezcla a diferentes velocidades, lo que provoca su separación. Cuando el frente del disolvente se encuentra próximo al extremo superior de la placa, esta se saca de la cubeta, se deja secar y se procede a la visualización de las manchas. (26)

La placa se coloca en una lámpara de luz UV, con el objetivo de determinar los grupos cromóforos presentes en las manchas. Se procede luego utilizar un agente revelador químico que es específico para cada metabolito secundario. (26)

3.15 Metodologías usadas para evaluar la actividad antimicrobiana.

Diferentes métodos de laboratorio pueden ser usados para determinar *in vitro* la susceptibilidad de bacterias ante agentes microbianos, pero estos no son igualmente sensibles o no se basan en los mismos principios, permitiendo que los resultados sean influenciados por el método seleccionado, los microorganismos usados y el grado de solubilidad de cada compuesto evaluado.

(57)

Uno de los métodos para evaluar la actividad antibacteriana es el de difusión en agar. Las técnicas de difusión han sido ampliamente usadas para evaluar extractos de plantas con actividad antimicrobiana. (26)

Las metodologías aplicadas siempre consideran la estandarización de la concentración bacteriana a utilizar, con el ánimo de evitar un crecimiento exhaustivo, que impida el análisis de los resultados o proporcione resultados errados lo cual puede variar significativamente la respuesta del extracto vegetal o aceite, indicando la necesidad de utilizar concentraciones mayores de éste para inhibir el crecimiento del microorganismo. La concentración de bacterias usada para el estudio de susceptibilidad en el laboratorio ha sido estandarizada en 1×10^8 unidades formadoras de colonias UFC/mL, lo cual equivale a un patrón de 0.5 en la escala de MacFarland. Es recomendable tomar el inóculo de cultivos en la fase exponencial de crecimiento y siempre tomar 4 o 5 colonias de un cultivo puro para evitar seleccionar variantes atípicas. Los medios de cultivo más utilizados en dichas técnicas son el agar Mueller Hinton y Agar Tripticasa Soya (TSA), ya que sus componentes facilitan el crecimiento de diferentes cepas bacterianas y mayor difusión de las muestras. (57)

3.15.1 Método de difusión en agar.

El método de difusión en agar está apoyado por datos clínicos y de laboratorios; y presenta la ventaja que sus resultados son altamente reproducibles. La técnica está basada en el método originalmente descrito por Bauer *et al.*, (método de Kirby-Bauer). Este método de difusión en disco o en pozo fue estandarizado y es actualmente recomendado por el Subcomité de Ensayos de Susceptibilidad de NCCLS, de Estados Unidos.

El fundamento de esta determinación es establecer, el efecto de un conjunto de

sustancias, ensayados individualmente, sobre las cepas bacterianas que se aíslan de procesos infecciosos. El método se basa en la relación entre la concentración de la sustancia necesaria para inhibir una cepa bacteriana y el halo de inhibición de crecimiento en la superficie de una placa de agar con un medio de cultivo adecuado y sembrado homogéneamente con la bacteria a ensayar y sobre la cual se ha depositado un disco de papel filtro de 6 mm de diámetro, o se ha sembrado en pozo impregnado con una cantidad conocida de la sustancia. (57)

En el caso de evaluar varias sustancias los pozos deben ponerse en forma equidistante. A continuación, se procede a su incubación a la temperatura adecuada por 24 horas luego se mide el halo de inhibición y se comparan los efectos de las distintas sustancias sobre el microorganismo estudiado, con el antibiótico control. La lectura de los resultados representa la actividad *in vitro* de la sustancia. Algunos autores refrigeran las cajas a 4°C para permitir la pre-difusión de los extractos antes de la incubación. (57)

Después de incubar durante la noche, el tamaño de la zona de inhibición del crecimiento alrededor del disco puede utilizarse como medida indirecta de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del organismo. (57)

También está influida por la tasa de desarrollo del organismo, capacidad de difusión del antimicrobiano y algunos factores técnicos. Los diámetros de las zonas de inhibición obtenidas con los diversos antibióticos se convierten en categorías “susceptible”, “moderadamente susceptible” y “resistente” con referencia a un cuadro (cuadro N° 9).

Este método es conveniente y flexible para bacterias aerobias y facultativas de rápido crecimiento como las Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* y *Staphylococcus*.

Cuadro N° 9. Tabla de referencia para evaluar susceptibilidad. ⁽²⁷⁾

	CMI (µg/mL)	Diámetro (mm)
Susceptible	≤4	≥20
Intermedio	8 – 16	15 – 19
Resistente	≥ 32	≤ 14

3.15.2 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).

La cuantificación de la actividad *in vitro* de los antimicrobianos se evalúa habitualmente mediante algunas de las variantes de los métodos de dilución. La CMI se ha establecido como “Gold Standard” frente a otros métodos que evalúan susceptibilidad antimicrobiana; además de confirmar resistencias inusuales, da respuestas definitivas cuando el resultado obtenido por otros métodos es indeterminado. ⁽⁵⁷⁾

Se puede realizar en micro dilución para lo cual se escogen las placas que tienen 96 pocillos en las que se estudia en cada una de ellas, el mismo microorganismo, 8 antimicrobianos y 11 diluciones (la última columna se suele utilizar como control de crecimiento) o viceversa. ⁽⁵⁷⁾ Sin embargo, tiene la particularidad que puede usarse y adaptarse a las necesidades de la investigación.

Las placas de micro dilución deben sellarse con adhesivo para evitar la evaporación del medio de cultivo cuando se incuben. Tras la incubación se observa la turbidez o se procede a la adición del bromuro de 3 (4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5difeniltetrazolium (MTT). Las células vivas y metabólicamente activas son capaces de reducir el MTT, de color amarillo en solución a formazán, compuesto insoluble que precipita en forma de cristales violeta, evidenciando de esta forma actividad metabólica. El pocillo que contenga la menor concentración

del agente que inhibe completamente el crecimiento define la CMI. ⁽⁵¹⁾ Puede utilizarse rezasurina, a cambio de MTT, la cual indica que hay actividad metabólica cuando toma un color rosado demostrando que la bacteria está viva y de un color morado cuando hay inhibición. ⁽⁵⁷⁾

3.15.3 Curva de muerte

La técnica de la curva de muerte mide la actividad microbicida de la combinación que se prueba. La curva de muerte proporciona una imagen dinámica de la acción e interacción antimicrobiana a lo largo del tiempo (en función de los recuentos de colonias en serie). ⁽³⁶⁾

Sin embargo, los recuentos repetitivos de colonias que requiere esta técnica son tediosos y limitan seriamente el número de concentraciones y combinaciones de antimicrobianos que se pueden analizar con cualquier aislado. Por lo tanto, si los resultados de laboratorio son útiles para guiar la terapia, es esencial que las concentraciones de antimicrobianos analizadas se elijan cuidadosamente y que representen concentraciones que se puedan lograr en el supuesto sitio de infección. Debido a que el medio se muestrea de forma repetitiva para el recuento de colonias, los estudios de la curva de muerte deben realizarse en medios líquidos y se requiere cuidado para evitar la contaminación. La mayoría de los experimentos se realizan con un inóculo final de 1×10^6 a 1×10^8 UFC/mL, que se produce diluyendo un cultivo nocturno del patógeno en caldo Mueller Hinton. ⁽³⁶⁾

El muestreo inicial para el recuento de colonias debe realizarse tan pronto como se agregue el inóculo (dentro de 5 minutos). Especialmente si se utilizan intervalos de muestreo cortos; los matraces de cultivo deben devolverse a la incubadora inmediatamente después de que se hayan retirado las alícuotas. ⁽³⁶⁾

3.15.4 Dilución Salina ⁽³⁶⁾

Como se realiza generalmente, este método utiliza una serie de tubos que contienen 4,5 ml de solución salina estéril (NaCl al 0.9%) u otro diluyente estéril apropiado. Una alícuota de muestra de 0,5 ml del cultivo en el primer tubo (produciendo una dilución 10^1) y luego, después de mezclar bien, transfiere 0,5 mL de ese tubo (con una nueva pipeta estéril) al siguiente tubo (que se convierte en el 10^2 dilución), repitiendo el procedimiento hasta que se hayan preparado una serie de tubos (generalmente de 10^1 a 10^8). ⁽³⁶⁾

Alícuotas precisas de estos tubos se colocan en una placa de agar sin antimicrobianos y se incuban durante la noche (o más, para organismos de crecimiento lento o cuando hay un efecto post antibiótico prolongado. Si se usan alícuotas de 0.1 mL, deben extenderse sobre la superficie de una placa de agar completa. Sin embargo, si se usan volúmenes más pequeños (por ejemplo, gotas de 0.025 mL), a menudo es factible usar una sola placa para los resultados de todas las diluciones de un recuento de colonias (Figura N°3).

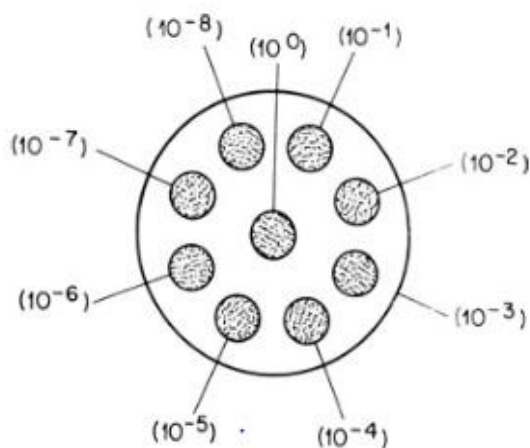


Figura N°3. Disposición de gotas de caldo de cultivo en una placa de agar para contar unidades formadoras de colonias por mililitro. Sombreado, área de la placa típicamente cubierta por gotas individuales de 0.025 mL de cada dilución de diez veces. ⁽³⁶⁾

Si se espera que el recuento de colonias sea cercano a cero, es útil colocar una parte alícuota de la muestra sin diluir en el centro de la placa (con el método de micropipeta) o usar una placa de agar adicional con 0.1 ml de material sin diluir (con el método de pipeta macro de 0.1 mL). (36)

En muchos casos, también es necesario determinar que el arrastre de antimicrobianos desde los tubos de dilución no es de magnitud suficiente para bajar falsamente el recuento de colonias resultante. Esto generalmente no es un problema cuando el conteo se realiza en gotas derivadas del cuarto o quinto tubo de dilución o más allá porque el proceso de dilución generalmente reduce las concentraciones de antimicrobianos residuales a niveles insignificantes. (36)

Las placas de agar utilizadas para el recuento de colonias no deben contener ningún antimicrobiano. Es importante no inclinar (y preferiblemente no mover) las placas sobre las que se han aplicado las gotas hasta que las gotas hayan tenido tiempo de secarse completamente. (36)

3.16 Técnicas de visualización microscópica de microorganismos

3.16.1 Microscopio Electrónico

El microscopio electrónico es nuestra ventana en los detalles más mínimos del mundo microscópico. Una de las características más impresionantes es la resolución que proporciona. El microscopio electrónico forma una imagen con un haz de electrones que se pueden hacer que viajen en patrones ondulados cuando se aceleran a altas velocidades. Estas ondas son 100,000 veces más cortas que las ondas de luz visible. Debido a que el poder de resolución es una función de la longitud de onda, los electrones tienen un poder extraordinario para resolver estructuras diminutas. Debido a que la resolución es tan sustancial, se deduce que el aumento también puede ser extremadamente alto, generalmente entre

5,000x y 750,000x para muestras biológicas y hasta 5,000,000x en algunas aplicaciones. (73)

En forma fundamental, el microscopio electrónico es un derivado del microscopio compuesto. Emplea componentes análogos, pero no necesariamente los mismos que los de la microscopía óptica. Por ejemplo, se amplía por etapas por medio de dos sistemas de lentes, y tiene una lente de condensación, un soporte para muestras y un aparato de enfoque. Una pistola de electrones dirige su haz a través de un vacío hacia electroimanes en forma de anillo que enfoca este haz en la muestra. Las muestras deben tratarse previamente con productos químicos o colorantes para aumentar el contraste y no pueden observarse en estado vivo. La imagen ampliada se muestra en una pantalla de visualización o se fotografía para su posterior estudio en lugar de ser observada a través de un ocular. Como las imágenes producidas por electrones carecen de color, las micrografías electrónicas (una micrografía es una fotografía microscópica) son siempre sombras de negro, gris y blanco. (73)

El microscopio electrónico de barrido proporciona algunas de las imágenes más dramáticas y realistas que existen. Este instrumento está diseñado para crear una vista tridimensional extremadamente detallada de cualquier cosa, desde el ojo de una mosca hasta los virus que escapan de su célula huésped. Para producir esta imagen, la microscopía electrónica de barrido no transmite electrones; bombardea la superficie de un espécimen entero recubierto de metal con electrones mientras se escanea de un lado a otro. Un sofisticado detector recoge una lluvia de electrones desviados de la superficie con gran fidelidad, y el patrón de electrones se muestra como una imagen en un televisor verde. Los contornos de los especímenes resueltos con microscopía electrónica de barrido son muy reveladoras y a menudo sorprendentes. Las áreas que se ven lisas y planas con el microscopio óptico muestran características intrigantes de la

superficie con el SEM. Se puede visualizar las imágenes en 3D de las características de la superficie celular y viral. (73)

Dicha microscopía es utilizada en las investigaciones para visualizar la existencia del daño celular que un microorganismo pueda sufrir por efecto de alguna sustancia.

CAPITULO IV

DISEÑO METODOLOGICO

4.0 DISEÑO METODOLOGICO

4.1 Tipo de estudio. ⁽⁵⁴⁾

El estudio realizado fue de tipo experimental y exploratorio.

- **Experimental:** ya que se realizaron pruebas experimentales *in vitro* con microorganismos de interés en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Química y Farmacia y en el Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) de la Universidad de El Salvador.
-
- **Exploratorio:** debido a la escasa información e investigación sobre composición química y actividades biológicas de propóleos de El Salvador.

4.2 Investigación bibliográfica

La investigación bibliográfica se llevó a cabo en las siguientes bibliotecas y bases de datos:

- Dr. Benjamín Orozco de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.
- Central de la Universidad de El Salvador.
- Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de El Salvador.
- Universidad Dr. José Matías Delgado.
- Base de datos ELSEVIER.
- Internet.

4.3 Investigación de campo

La recolección de muestras de propóleos crudos se realizó por los apicultores en diferentes municipios de los departamentos de El Salvador, los cuales fueron

colectados en el período de junio a julio de 2019, y posteriormente entregados a los investigadores.

4.3.1 Recolección de las muestras de propóleos.

Las muestras de propóleos crudo fueron recolectadas en el período de junio a julio de 2019 por los apicultores en los municipios de Armenia, departamento de Sonsonate; Santiago Texacuangos, departamento de San Salvador; Olocuilta, departamento de La Paz; Jocoaitique, departamento de Morazán; La Palma, departamento de Chalatenango; San Alejo, departamento de La Unión y Jayaque, Huizúcar, Colón, Ciudad Arce, departamento de La Libertad para posteriormente ser entregadas a los investigadores para su identificación y codificación según lugar de procedencia.

Dichas muestras fueron depositadas en bolsas plásticas y/o herméticos de plástico protegidas de la luz para ser transportadas y almacenadas a una temperatura entre -2 a -18°C.

4.3.2 Universo

Las colmenas ubicadas en los municipios de los departamentos de Sonsonate, La Libertad, San Salvador, La Paz, Morazán, Chalatenango y La Unión.

4.3.3 Muestra

Diez muestras de propóleos, de todas las colmenas de los apiarios muestreados, recolectadas por el método de raspado por los apicultores de los municipios de Armenia, Jocoaitique, La Palma, Jayaque, Huizúcar, Colón, Ciudad Arce, Santiago Texacuangos, Olocuilta y San Alejo, de El Salvador hasta que se obtuvo

un peso de aproximadamente 200 gramos.

4.3.4 Tipo de muestreo.

No probabilístico por conveniencia, debido a que fueron seleccionados apiaros y apicultores que aceptaran ser incluidos en este estudio, considerando la accesibilidad y proximidad de éstos en los diferentes municipios de El Salvador.

4.4 Parte Experimental.

4.4.1 Identificación de muestras de propóleos

Las muestras de propóleos fueron proporcionadas por los apicultores colaboradores, de los diferentes municipios, colectados en el periodo de junio a julio de 2019 fueron entregados a los investigadores (Ver **Anexo N° 1**). Dichas muestras fueron identificadas en una hoja de recolección de datos y codificadas, según su lugar de procedencia, y descritas según sus características organolépticas (color, aspecto, olor, consistencia y sabor) según el criterio de la NSO 65.19.02:03 ^(17, 75) (Ver **Anexo N° 2**).

4.4.1.1 Descripción de Características Organolépticas.

4.4.1.1.1 Color:

- 1) Colocar una cantidad aproximada a 2 gramos de muestra sobre un vidrio de reloj.
- 2) Observar el color de la muestra que puede variar entre café, verde, gris y otras tonalidades conforme a su origen botánico.)

4.4.1.1.2 Aspecto:

- 1) Colocar una cantidad aproximada a 2 gramos de muestra sobre un vidrio de

reloj.

- 2) Tomar una porción de la muestra y observar su aspecto que puede variar entre masa redonda con brillo, masa irregular con poco brillo, trozos irregulares opacos, trozos irregulares con brillo y polvo o granulado.

4.4.1.1.3 Olor:

- 1) Colocar una cantidad aproximada a 2 gramos de muestra sobre un vidrio de reloj.
- 2) Percibir el olor colocando dicha muestra cerca de la nariz y describirlo el cual puede variar entre resinoso, resinoso suave, resinoso aromático, resinoso muy aromático.

4.4.1.1.4 Consistencia

- 1) Colocar una cantidad aproximada a 2 gramos de muestra sobre un vidrio de reloj.
- 2) Tomar una porción de la muestra y palpar con los dedos para percibir su consistencia que puede variar entre muy blanda, blanda, poco blanda y dura.

4.4.1.1.5 Sabor:

- 1) Colocar una cantidad aproximada a 2 gramos de muestra sobre un vidrio de reloj.
- 2) Tomar una pequeña porción y percibir su sabor que puede variar entre picante, dulce, amargo e insípido.

4.4.2 Preparación de extractos hidroalcohólicos de propóleos. (13, 19, 57) (Ver Anexo N° 3)

- Limpiar las 10 muestras de propóleos y triturar la muestra.
- Transferir 80.0 g a un vaso de precipitado con 1 litro de etanol 80%.

- Ultrasonicar por 90 minutos.
- Macerar a temperatura ambiente por 3 días protegido de la luz.
- Filtrar en papel filtro (Whatmann).
- Llevar el filtrado al rotavapor a 100 rpm y 50°C ± 2 °C hasta un punto cercano a sequedad.
- Transferir a tubos Falcon de 50 mL y colocar en el equipo Genevac® EZ-2 Plus Evaporator hasta sequedad.
- Colocar en el ultracongelador a -40°C durante la noche.
- Liofilizar.
- Guardar el extracto liofilizado en refrigeración protegido de la luz.
- Calcular el porcentaje de rendimiento con la siguiente fórmula:

$$\%Rendimiento = \frac{\text{Peso extracto seco}}{\text{Peso inicial del propoleos}} \times 100$$

4.4.3 Identificación cualitativa de metabolitos secundarios por Cromatografía en Capa Fina. ⁽²²⁾ (Ver Anexo N° 4)

- **Fase estacionaria:** Cromatoplasmas de Aluminio recubiertas de Sílice Gel GF254 Marca Merck 20 x 20 cm.
- **Fase móvil:** n-Hexano, Acetato de Etilo, Ácido Acético (60:30:0.5)
- **Revelador:** reactivo óleum (ácido acético glacial: ácido sulfúrico: agua destilada 20:1:4) con calor.
- **Evidencias:** manchas color azul fluorescente visualizado en luz UV a 254 nm antes de adicionar el revelador (cumarinas).
Manchas color ocre (triterpenos), manchas color amarillo (chalconas), manchas color violeta (diterpenos), manchas de naranja a rojo (flavonoides) después de agregar el reactivo revelador y calentar a 105 °C.
- **Estándares:** β-amirina (triterpenos), kukulkanina A (chalconas), ácido isocuprésico (diterpenos), quercetina (flavonoides), umbeliferona

(cumarinas).

- Preparar la fase móvil.
- Saturar la cámara Cromatográfica con la respectiva fase móvil durante 1 hora.
- Preparar los estándares de β -amirina, kukulkanina A, ácido isocuprésico, quercetina y umbeliferona con concentración de 0.50 mg/mL.
- Medir 1.0 cm. de altura de base a la placa cromatográfica y 1.0 cm. en el borde superior con suavidad sin levantar el adsorbente.
- Aplicar con un tubo capilar los estándares previamente preparados, en el carril 11 colocar el estándar de beta-amirina, en el 12 el estándar de kukulkanina, para el carril 13 adicionar el ácido isocupresico, en el carril 14 agregar estándar de quercetina y carril 15 la cumarina.
- Aplicar con un tubo capilar las muestras de extractos de propóleos en los carriles del 1 al 10, de la siguiente manera; carril 1 Armenia, Sonsonate; carril 2 Jocoaitique, Morazán; carril 3 La Palma, Chalatenango; carril 4 Jayaque, La Libertad; carril 5 Huizúcar, La Libertad; carril 6 Colón, La Libertad; carril 7 Santiago Texacuangos, San Salvador; carril 8 Ciudad Arce, La Libertad; carril 9 San Alejo, La Unión; y carril 10 Olocuilta, La Paz.
- Colocar la placa inyectada dentro de la cámara cromatográfica previamente saturada.
- Permitir que la fase móvil eluya hasta la línea del frente del solvente.
- Sacar la placa cromatográfica y dejarla secar.
- Observar a la luz UV a una longitud de onda de 254 nm.
- Rociar la placa cromatográfica con el reactivo revelador y calentar en hot-plate a 105°C, en campana de extracción de gases.
- Marcar y medir el desplazamiento de las manchas de muestras y estándares.
- Observar las coloraciones de las bandas y documentar los valores de Rf.

4.4.4 Preparación de cultivo de trabajo. (18, 34)

Se utilizaron las siguientes cepas de microorganismos: Escherichia coli

ATCC25922, Pseudomona aeruginosa ATCC9027, Salmonella entérica serovar typhimurium ATCC14028, Bacillus subtilis subsp. spizizenii ATCC6633, Staphylococcus aureus ATCC25923 y Candida albicans ATCC10231.

Las cepas estaban contenidas en crioviales y/o pellet, por lo que fueron reconstituidas para su uso, realizando el siguiente procedimiento (Ver **Anexo N° 5**):

- Tomar una asada de cada criovial conteniendo las cepas y suspender en caldo nutritivo (para bacterias) y caldo Sabouraud dextrosa (para levadura) e incubar a temperatura de $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 18 a 24 horas.
- Tomar una asada de la suspensión de microorganismo correspondiente y realizar estriado en tres tubos con agar de cultivo inclinado (agar nutritivo para bacterias y agar Sabouraud para levadura) e incubar a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 18 a 24 horas.
- Agregar tres esferas de vidrio estériles, 1mL de solución salina estéril y arrastrar el crecimiento de la superficie del bisel.
- Transferir la suspensión generada a un tubo estéril.
- Transferir una alícuota de la suspensión anterior a 5 mL de solución salina estéril. Leer en un espectrofotómetro Uv/Vis a 580nm y ajustar la transmitancia de la suspensión, para bacterias entre 25% y 35% y para levadura entre 0.5 y 5%.
- Realizar la verificación del recuento de las suspensiones estandarizadas, morfología macroscópica y microscópica.

NOTA: Dicha suspensión puede utilizarse durante un periodo máximo de cinco días, bajo refrigeración a temperatura de 4°C a 8°C . Al transcurrir este tiempo, es necesario realizar de nuevo el procedimiento de preparación de cultivo de trabajo.

4.4.5 Verificación del recuento de las suspensiones estandarizadas. ⁽¹⁸⁾ (Ver

Anexo N° 6).

- Transferir una alícuota de 0.1 mL de suspensión estandarizada en el procedimiento anterior a 9.9 mL de Solución Salina Estéril (dilución 1:100 o 10^{-2}).
- Hacer dos diluciones 1:100 adicionales (10^{-4} y 10^{-6}) y luego hacer una dilución 1:10 para obtener la dilución 10^{-7} .
- Realizar el recuento en placa de la siguiente manera:
 Por duplicado alícuotas de 1mL y de 0.1mL de la dilución 10^{-7} en el caso de bacterias.
 Por duplicado alícuotas de 1mL de las diluciones de 10^{-6} y 10^{-7} en el caso de levadura.
- Adicionar el medio adecuado de acuerdo con el tipo de microorganismo e incubar.
- Realizar los cálculos necesarios para determinar la cantidad de microorganismo presentes en la suspensión estandarizada.
 NOTA: realizar este procedimiento el día en que se utiliza la suspensión de microorganismo para los diferentes ensayos microbiológicos.

4.4.6 Selección de antibiótico y antimicótico como control positivo de inhibición y determinación de su concentración mínima inhibitoria (CMI). (27, 57, 62, 78)

Para dicho ensayo, se evaluaron los antibióticos amoxicilina, ampicilina y amikacina para bacterias, para ser utilizado como control positivo de inhibición, mientras que, para la levadura, se evaluó el antimicótico clotrimazol.

- Preparar las diluciones seriadas para obtener concentraciones de $2\mu\text{g/mL}$, $4\mu\text{g/mL}$, $8\mu\text{g/mL}$, $16\mu\text{g/mL}$, $32\mu\text{g/mL}$ y $64\mu\text{g/mL}$.
- Se utilizaron 2 placas de 96 pocillos estériles, las cuales constan de 12 columnas por 8 filas.
- Las filas de la **placa 1** fueron divididas de la siguiente manera: (Ver **Anexo**

N° 7).

Las filas A-B: Evaluación de antibióticos frente a *Pseudomona aeruginosa* ATCC9027.

Las filas C-D: Evaluación de antibióticos frente a *Salmonella enterica serovar typhimurium* ATCC14028.

Las filas E-F: Evaluación de antibióticos frente a *Escherichia coli* ATCC25922.

La fila G-H: control de esterilidad.

- Las filas de la **placa 2** fueron divididas de la siguiente manera: Ver **Anexo N° 8).**

Las filas A-B: Evaluación de antibióticos frente a *Staphylococcus aureus* ATCC25923.

Las filas C-D: Evaluación de antibióticos frente a *Bacillus subtilis subsp. spizizenii* ATCC6633.

La fila E: Evaluación de antimicótico frente a *Candida albicans* ATCC10231

La fila F-H: Control de esterilidad.

- Agregar 100µL de medio de cultivo (Caldo Mueller Hinton para bacterias y Caldo Sabouraud para levadura) a cada uno de los pocillos.
- Agregar 20 µL de suspensión de microorganismo correspondiente.
- Agregar 100 µL de la dilución de antibiótico o antimicótico correspondiente, tomando en cuenta la siguiente distribución:

Placa 1:

- A las filas A, C, E y columnas 1 a la 6, agregar el antibiótico amoxicilina. A las columnas 7 a 12 agregar el antibiótico amikacina.
- A las filas B, D, F y columnas 1 a la 6, agregar el antibiótico ampicilina. Las columnas 7 a 12 se utilizan como control de crecimiento de microorganismo.
- A todos los pocillos de las filas G y H, agregar caldo Mueller Hinton.

Placa 2:

- A las filas A, C y columnas 1 a la 6, agregar el antibiótico amoxicilina. A las columnas 7 a 12 agregar el antibiótico amikacina.
- A las filas B, D y columnas 1 a la 6, agregar el antibiótico ampicilina. Las columnas 7 a 12 se utilizan como control de crecimiento de microorganismo.
- A la fila E y columnas 1 a la 6, agregar el antimicótico clotrimazol. Las columnas 7 a 12 se utilizan como control de crecimiento de microorganismo.
- A todos los pocillos de las filas F, Caldo Sabouraud Dextrosa y a los pocillos de las filas G y H, agregar caldo Mueller Hinton.
- Cubrir la placa e incubar a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 18 a 24 horas.
- Agregar $30\mu\text{L}$ de resazurina a todos los pocillos, cubrir la placa e incubar a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 2 horas.

4.4.7 Ensayo de Difusión en agar. (27, 60, 76)

- De los extractos secos que se encontraban refrigerados, se prepararon las diluciones de cada extracto a las concentraciones de 12, 6, 3, 1.5, 1, 0.5, 0.25 y 0.125 mg/mL . (Ver Anexo N° 9)
- Preparar placas con 20mL de agar Mueller Hinton (para bacterias) y Sabouraud dextrosa (para levadura).
- Perforar el medio de cultivo con un orador estéril para formar pocillos de 4mm , de modo que, se realicen 6 pocillos por placa.
- Tomar con un hisopo estéril de la suspensión de microorganismo correspondiente previamente estandarizada a $1 \times 10^8\text{ UFC/mL}$ para bacterias y $1 \times 10^5\text{ UFC/mL}$ para levadura y realizar hisopado en la placa correspondiente.
- Agregar $100\mu\text{L}$ de la dilución de extracto correspondiente a cada pocillo.
- Agregar $100\mu\text{L}$ de la concentración de antibiótico correspondiente a su CMI como control positivo de inhibición.
- Agregar $100\mu\text{L}$ de DMSO 10% como control solvente.

- Dejar reposar por 1 hora para permitir la difusión del extracto en el medio de cultivo.
- Incubar a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 18 a 24 horas
- Realizar la medida de los diámetros de la zona de inhibición.

4.4.8 Ensayo de Concentración Mínima Inhibitoria. (57) (60) (62) (79)

Dicho ensayo sólo se realizó con aquellos extractos que presentaron zona de inhibición en el ensayo de difusión en agar.

- Realizar diluciones seriadas con dimetilsulfóxido 10% (DMSO) para obtener nueve concentraciones diferentes del extracto de propóleos en evaluación, teniendo en cuenta que, en el proceso de microdilución, la concentración de los extractos disminuye al ser agregada en los pocillos por el caldo de cultivo, preparándolos así a una concentración mayor para obtener la concentración final deseada de 64, 128, 256, 512, 1024, 2048, 4096, 8192, 16384 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del extracto perteneciente a Huizúcar, La Libertad y 256, 512, 1024, 2048, 4096, 8192, 16384, 32768, 62536 $\mu\text{g}/\text{mL}$ del extracto perteneciente a San Alejo, La Unión.
- La microplaca cuenta con 12 columnas y 8 filas. Las columnas 1 a la 9 corresponden a las concentraciones del extracto de menor a mayor. La columna 10 corresponde al control de crecimiento. La columna 11 corresponde al control positivo de inhibición. La columna 12 corresponde al control de esterilidad.
- Las filas A, B, C y F, G, H corresponden al análisis por triplicado del extracto que presento actividad inhibitoria en el ensayo de difusión en agar.
- Agregar a todos los pocillos 100 μL de caldo Mueller Hinton.
- Agregar a las columnas 1 a la 11, 20 μL de suspensión de microorganismo correspondiente, previamente estandarizada, para obtener un inóculo final aproximadamente de 5×10^5 UFC/mL.

- Agregar a las columnas 1 a la 9, 100µL de la dilución de extracto de propóleos correspondiente.
- Agregar a la columna 11, 100µL del antibiótico correspondiente.
- Cubrir la placa e incubar a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 18 a 24 horas.
- Agregar 30µL de resazurina a todos los pocillos, cubrir la placa e incubar a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 2 horas.

4.4.9 Ensayo de Curva de Muerte. (36) (57) (60)

- Preparar una suspensión microbiana con 1×10^8 UFC/mL en caldo Mueller Hinton.
- Rotular tubos Eppendorff con las diluciones 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} .
- Agregar la cantidad necesaria de suspensión de microorganismos y extractos de propóleos a evaluar, de manera que, se obtenga un volumen final de 1000µL con concentración microbiana de 1×10^7 UFC/mL y concentración final de extracto de propóleos igual a la concentración mínima inhibitoria en evaluación.
- Tomar 100µL del tubo anterior y agregarla al tubo correspondiente (10^{-1}) que contiene 900 µL solución salina estéril y agitar.
- Tomar una alícuota de 10 µL y realizar microgota.
- Tomar 100µL del tubo de la solución anterior y agregarla al tubo correspondiente (10^{-2}) que contiene 900 µL solución salina estéril y agitar.
- Tomar una alícuota de 10 µL y realizar microgota.
- Repetir los pasos anteriores hasta obtener la dilución 10^{-6} , realizando microgota en cada dilución.
- Incubar a $35^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ por 18 a 24 horas.
- Repetir el procedimiento para los tiempos 2, 4, 6, 8, 12, 24, 26 h.

Realizar mismo procedimiento para suspensión de microorganismo como control de crecimiento y con el antibiótico seleccionado con su respectiva Concentración Mínima Inhibitoria como control positivo de inhibición.

4.4.10 Microscopía Electrónica de Barrido. ⁽³⁹⁾

1. Preparar una suspensión microbiana con 1×10^8 UFC/mL en caldo Mueller Hinton.
2. Agregar la cantidad necesaria de suspensión de microorganismo y extracto de propóleos a evaluar, de manera que, se obtenga un volumen final de $1000 \mu\text{L}$ con concentración microbiana de 1×10^8 UFC/mL y concentración final de extracto de propóleos igual a la Concentración Mínima Inhibitoria en evaluación e incubar a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 18 a 24 horas.
3. Centrifugar a 16000rpm por 15 minutos.
4. Fijar los microorganismos, agregando Glutaraldehído al 2.5% en buffer fosfato y dejar reposar por una noche a 4°C .
5. Realizar dos lavados de 10 minutos cada uno, con buffer fosfato.
6. Agregar Osmio y dejar reposar por 1 hora a temperatura de 4°C .
7. Realizar dos lavados adicionales de 10 minutos con buffer fosfato.
8. Deshidratar las muestras agregando alcohol a 30%, 50% 70%, 80%, 90% y 100% por 10 minutos cada adición.
9. Agregar mezcla de alcohol acetona en proporciones de 3:1; 2:2; 1:3 y acetona pura; dejar reposar por 10 minutos luego de cada adición.
10. Realizar secado por punto crítico en el equipo BAL-TEC CPD 030 Critical Point Dryer utilizando canastas Microporus Specimen Capsules 30 microns de medidas 12mmOD x 11mmH.
11. Realizar recubrimiento con oro en el equipo BAL-TEC SCD 050 Sputter Coater.
12. Observar al microscopio de barrido.

CAPITULO V

RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

5.0 RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

Las muestras de propóleos de los municipios de La Palma, Colón, Ciudad Arce, Huizúcar, Jayaque, Olocuilta y Santiago Texacuangos representan el 70% de las muestras que pertenecen a la Zona Central de El Salvador. Así mismo, las muestras de los municipios de Jocoaitique y San Alejo representan el 20% de las muestras las cuales pertenecen a la Zona Oriental del país. Conjuntamente, se obtuvo una muestra del municipio de Armenia perteneciente a la Zona Occidental del país, la cual representa el 10% de las muestras.

Los propóleos de Armenia presentaron un color café con un aspecto de masa irregular con poco brillo, olor resinoso aromático, consistencia blanda, mientras que, los obtenidos de Jocoaitique fueron de color café oscuro con aspecto de masa irregular con poco brillo olor resinoso suave de consistencia poco blanda.

En cuanto a los propóleos de La Palma, su color fue café con aspecto de masa irregular con poco brillo de olor resinoso muy aromático y blandos. Del mismo modo, los propóleos de Jayaque se presentaron de color gris trozos irregulares opacos de olor resinoso aromático poco blandos. Los propóleos de Huizúcar mostraron color café oscuro con aspecto de masas irregulares con poco brillo, olor resinoso aromático y blandos. Los propóleos de Colón se evidenciaron de color café oscuro, trozos irregulares opacos de olor resinoso aromático y poco blandos, siendo estas propiedades compartidas con los propóleos de Santiago Texacuangos, a excepción del color de este último, siendo café grisáceo. Los propóleos procedentes de Ciudad Arce presentaron color café claro en forma trozos irregulares opacos con olor resinoso suave y poco blandos. Todas las muestras fueron insípidas.

Los resultados obtenidos se presentan de forma resumida en el **cuadro N° 10**.

Cuadro N° 10. Resultados de propiedades organolépticas de muestras crudas de propóleos.

	Procedencia	Propiedades organolépticas				
		Color	Aspecto	Olor	Consistencia	Sabor
E1	Armenia, Sonsonate	Café	MIPB	RA	B	In
E2	Jocoaitique, Morazán	Café oscuro	MIPB	RA	PB	In
E3	La Palma, Chalatenango	Café	MIPB	RMA	B	In
E4	Jayaque, La Libertad	Gris	TIO	RA	PB	In
E5	Huizúcar, La Libertad	Café oscuro	MIPB	RA	B	In
E6	Colón, La Libertad	Café oscuro	TIO	RA	PB	In
E7	Santiago Texacuangos, San Salvador	Café grisáceo	TIO	RA	PB	In
E8	Ciudad Arce, La Libertad	Café claro	TIO	RS	PB	In
E9	San Alejo, La Unión	Café verdoso	TIO	RS	D	In
E10	Olocuilta, La Paz	Café oscuro	MIPB	RA	PB	In

MRB: Masa redonda con brillo; MIPB: Masa irregular con poco brillo; TIO: Trozos irregulares opacos; TIB: Trozos irregulares con brillo; PG: Polvo o granulado; I: Inodoro; R: Resinoso; RS: Resinoso suave; RA: Resinoso aromático; RMA: Resinoso muy aromático; MB: Muy Blanda; B: Blanda; PB: Poco blanda; D: Dura; P: Picante; Du: Dulce; A: Amargo; In: Insípido.

Lozina et al. (2010) ⁽³⁷⁾, obtuvieron muestras de propóleos crudas con colores marrón oscuro con tintes rojizos, verdes y amarillos; además las muestras de

propóleos se presentaron en forma de trozos irregulares, en su mayoría opacos. Su consistencia varió entre maleable a rígida y sus sabores entre amargo, insípido, dulce y picante. Galindo et al. (2016) ⁽²³⁾, exponen que obtuvieron muestras en forma de conglomerados en forma de briquetas, aromas resinosos, opacos, desde color amarillo claro hasta el castaño oscuro con luminosidad.

La variabilidad en las características organolépticas reportadas por otros autores también pudo ser evidenciada durante la presente investigación en la cual cada muestra de propóleos presentó características organolépticas diferentes entre sí según la zona de recolección y por consiguiente, variación respecto a muestras de otros países. Una conglomeración en forma de bloques es atribuida al método de obtención y/o recolección ⁽³⁷⁾, que en la mayoría de los casos es por raspado, y también a su forma de almacenamiento ⁽²⁾. La variación del aroma está atribuida a la riqueza de aceites esenciales ⁽²³⁾ y a la flora existente en la región apiaria ⁽³⁵⁾.

El color y la luminosidad están atribuidos al origen botánico de la resina, época de recolección y la edad de la especie botánica ⁽²³⁾. Su aspecto opaco es por la posible oxidación de las resinas presentes ⁽³⁷⁾. Su dureza se asocia a que las abejas por instinto agregan suelo y restos de plantas que le conferirían dureza, pues a altas temperaturas de las regiones apícolas, ablandaría los propóleos y por lo tanto éste ya no cumpliría la función de hermetizar la colmena ⁽³⁵⁾, además, relacionado con el momento del día en que es recolectada la muestra ⁽²⁾.

Los extractos obtenidos fueron de consistencia blanda resinosa pegajosa. Los porcentajes de rendimiento oscilaron entre 9.31% y 42.65% correspondiendo el menor porcentaje al extracto de propóleos de Jocoaitique, Morazán y el mayor porcentaje al extracto de propóleos de La Palma Chalatenango.

Los resultados obtenidos se resumen en el cuadro N° 11.

Cuadro N° 11. Porcentajes de rendimiento de extractos secos de propóleos.

Cód	Procedencia	Porcentaje de rendimiento (%)
E1	Armenia, Sonsonate	13.24
E2	Jocoaitique, Morazán	9.31
E3	La Palma, Chalatenango	42.65
E4	Jayaque, La Libertad	13.68
E5	Huizúcar, La Libertad	34.48
E6	Colón, La Libertad	10.00
E7	Santiago Texacuangos, San Salvador	12.65
E8	Ciudad Arce, La Libertad	16.76
E9	San Alejo, La Unión	23.53
E10	Olocuilta, La Paz	37.93

Bankova et al. (2019) ⁽⁴⁾ indica un procedimiento general, el cual sugiere el alcohol como solvente a concentraciones que pueden variar de 70% a 96%, donde además, sugiere colocar la muestra en el congelador a una temperatura de aproximadamente -20°C y la disminución de su tamaño de partícula con el objetivo de facilitar el proceso de extracción de sus metabolitos secundarios, seguido de una maceración y extracción ultrasónica para luego filtrar y ser sometido a procesos de secado para la obtención de extractos secos mediante diferentes métodos, entre ellos la liofilización. La liofilización fue el método de secado llevada a cabo en esta investigación, que permitió obtener extractos que no resultaron en polvo, lo cual se sugiere ser causado por las altas concentraciones de etanol (80%) usadas para su extracción y por tanto se obtuvo extractos como una pasta pegajosa. ⁽³¹⁾

Así como Bankova et al. (2019) ⁽⁴⁾, indicaba un procedimiento general similar al utilizado en esta investigación, donde sugiere alcohol entre 70% al 96% para obtener extractos sin cera, congelación, disminución de tamaño de partícula, maceración y liofilización, también Chen (2011) ⁽¹⁵⁾ plantea el uso de mezclas hidroalcohólicas como mezclas de solvente adecuado para obtener extractos sin cera y que, además, este tipo de mezclas ha sido la elección preferida por la variedad de compuestos con diferente polaridad que es capaz de extraer y que junto con la extracción asistida con ultrasonido permite una mejor capacidad extractora.

Los porcentajes de rendimiento obtenidos durante esta investigación oscilaron entre 9.31% y 42.65%, posiblemente influenciado por el origen de la muestra debido al contenido de ceras, así como todos los compuestos insolubles en estos solventes. Factores como proporciones de etanol y agua, el tiempo de maceración, la asistencia con ultrasonido, su composición química y concentración.

La fase móvil n-Hexano, Acetato de Etilo, Ácido Acético (60:30:0.5), fue utilizada para llevar a cabo el ensayo de Cromatografía en Capa Fina, debido a la polaridad generada por dicha mezcla.

Al llevar a cabo la cromatografía en capa fina y visualizar bajo luz UV a 254nm (ver **figura N° 3**) se observó en el carril 15 una mancha azul fluorescente con un R_f de 0.21 correspondiente al estándar cumarinas. Las muestras estudiadas no presentaron ninguna coloración bajo estas condiciones, por tanto, no hay evidencia de presencia de estos metabolitos.

Por otra parte, al ser utilizado óleum y calor como reactivo revelador, los estándares para triterpenos, chalconas, diterpenos y flavonoides en los carriles

11 al 14 se evidenciaron por la presencia de manchas color ocre (triterpenos), manchas color amarillo (chalconas), manchas color violeta (diterpenos), manchas color naranja a rojo (flavonoides), (ver **figura N° 5**). y valores de Rf de 0.66, 0.42, 0.21 y 0.06 respectivamente.

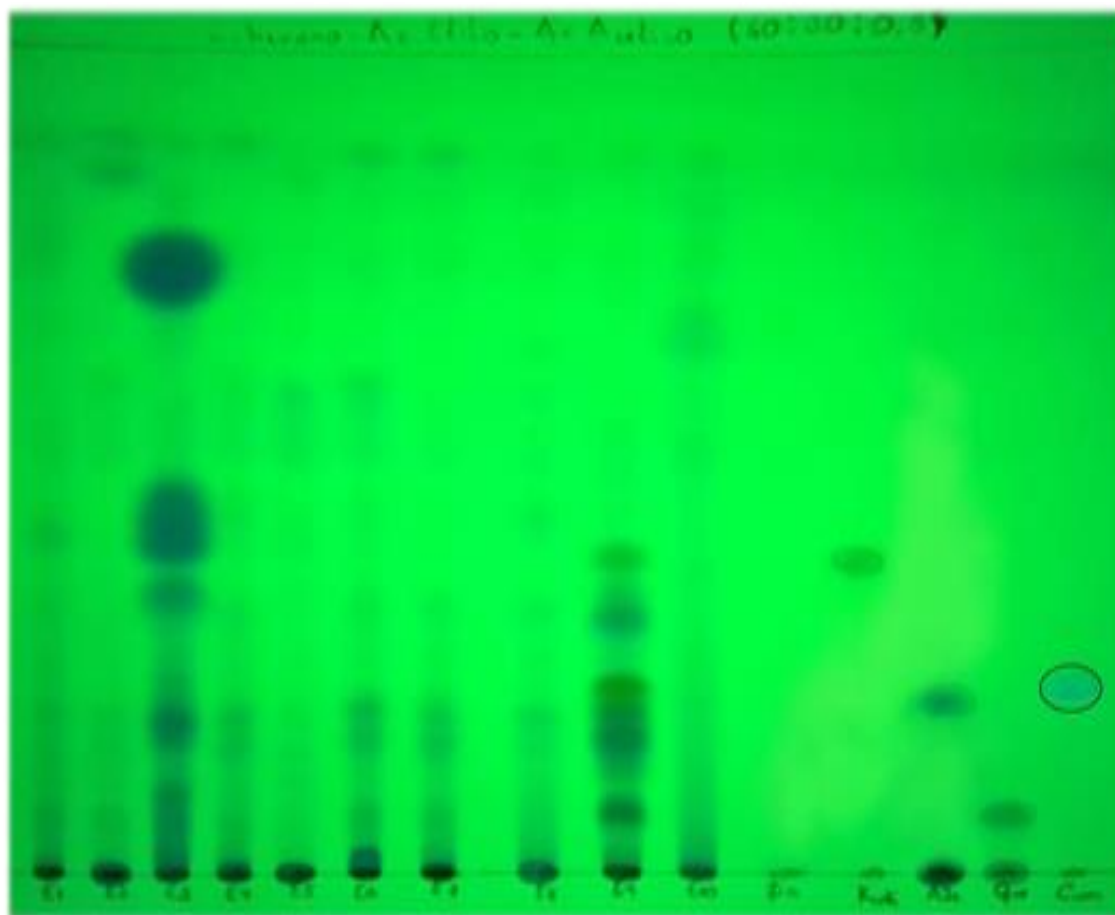


Figura N° 4. Cromatografía en capa fina revelada bajo luz UV de onda corta ($\lambda=254\text{nm}$).

En cuanto a las muestras estudiadas durante esta investigación, se evidenció presencia de triterpenos debido a las manchas de color ocre en las muestras E1, E2, E4, E5, E6, E7, E8, E9, E10 y valores de Rf de 0.66, 0.66, 0.67, 0.67, 0.66, 0.67, 0.67, 0.66 y 0.66, respectivamente. La muestra E5 presentó chalconas evidenciado por la mancha de color amarillo y valor de Rf de 0.42. La muestra

E3 presentó diterpenos debido a la mancha de color violeta con un valor de Rf de 0.20 mientras que la muestra E9 evidenció presencia de flavonoides debido a la mancha color amarillo y valor de Rf de 0.06.



Figura N° 5. Cromatografía en capa fina revelada con reactivo óleum y calor (105°C).

Cuadro N° 12. Resultado de perfil cromatográfico de extractos de propóleos.

Código	Procedencia	Metabolitos Secundarios				
		Tri	Cha	Dit	Fla	Cum
E1	Armenia, Sonsonate	(+) (Rf=0.66)	(-)	(-)	(-)	(-)
E2	Jocoaitique, Morazán	(+) (Rf=0.66)	(-)	(-)	(-)	(-)
E3	La Palma, Chalatenango	(-)	(-)	(+) (Rf=0.2)	(-)	(-)
E4	Jayaque, La Libertad	(+) (Rf=0.67)	(-)	(-)	(-)	(-)
E5	Huizúcar, La Libertad	(+) (Rf=0.67)	(+) (Rf=0.42)	(-)	(-)	(-)
E6	Colón, La Libertad	(+) (Rf=0.66)	(-)	(-)	(-)	(-)
E7	Santiago Texacuangos, San Salvador	(+) (Rf=0.67)	(-)	(-)	(-)	(-)
E8	Ciudad Arce, La Libertad	(+) (Rf=0.67)	(-)	(-)	(-)	(-)
E9	San Alejo, La Unión	(+) (Rf=0.66)	(-)	(-)	(+) (Rf=0.06)	(-)
E10	Olocuilta, La Paz	(+) (Rf=0.66)	(-)	(-)	(-)	(-)

Tri: Triterpenos (Rf=0.66); **Cha:** Chalconas (Rf=0.42); **Dit:** Diterpenos (Rf=0.21); **Fla:** Flavonoides (Rf=0.06); **Cum:** Cumarinas (Rf=0.21); **(+):** presencia; **(-):** ausencia

Las muestras pertenecientes a diferentes regiones de El Salvador utilizadas en esta investigación presentaron similitudes, en las que se destaca la presencia de triterpenos en nueve de las diez muestras, siendo únicamente la proveniente de La Palma, Chalatenango que no presentó este grupo de metabolitos secundarios, sin embargo, esta misma fue la única en presentar diterpenos. Respecto a la presencia de flavonoides, únicamente se identificó su presencia en la muestra proveniente de San Alejo, La Unión mientras que, en la muestra de Huizúcar, La Libertad, se presentaron flavonoides de tipo chalconas. Cabe destacar que, ninguna de las muestras analizadas presentó cumarinas. (ver cuadro N° 12).

Si bien la composición química de los propóleos está sujeta a variación, en El Salvador, sólo existen pocos análisis previos sobre su composición; uno de ellos realizados en el año 2001 en el cual se reporta la presencia de dos tipos de chalconas ⁽⁵³⁾ mientras que en otro estudio realizado en el mismo año se reporta la presencia de diterpenos en propóleos de Usulután. ⁽⁵⁵⁾

Ciertamente, la composición química de los propóleos está sujeta a cambios influenciada claramente por su lugar de origen; en Honduras, Colombia, Venezuela, Brasil, Tailandia y Nigeria se reporta la presencia de triterpenos; propóleos de Colombia, Venezuela, Brasil, Argelia y Australia presentaron diterpenos. Muestras de propóleos de Canadá, Estados Unidos, México, Cuba, Honduras, Venezuela, Brasil, Uruguay, Argentina, Chile, Francia, Argelia, Portugal, Ecuador y Reino Unido presentaron flavonoides mientras que, en propóleos de Canadá, Estados Unidos, Honduras, Argentina y Corea, se reporta presencia de flavonoides de tipo chalconas. ^(1, 69)

Aunque no fueron identificadas cumarinas durante la presente investigación, son pocos los países que reportan su presencia, entre ellos se encuentran Turquía ⁽⁶⁾ y Argentina ⁽¹¹⁾.

Cabe destacar que la variación en su composición siempre es atribuida a la flora circundante a la colmena de donde fue extraída la muestra de propóleos.

Para llevar a cabo los ensayos microbiológicos, se realizó la selección de antibiótico y antimicótico, acorde a los antibióticos con los que se contaba en el laboratorio de microbiología y con respecto a su espectro de acción, realizando para ello una CMI de estos antibióticos y antimicótico sobre los microorganismos a evaluar, donde se obtuvo un resultado para el antibiótico amikacina: 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis sub. Spizizenni* respectivamente, para *Salmonella typhimurium* una CMI de 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En cuanto al micoticotico clotrimazol presento una CMI de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$. como control positivo de inhibición y la determinación de su concentración mínima inhibitoria. Los resultados de dicho ensayo se evidencian en la figura N° 5 y N° 6.

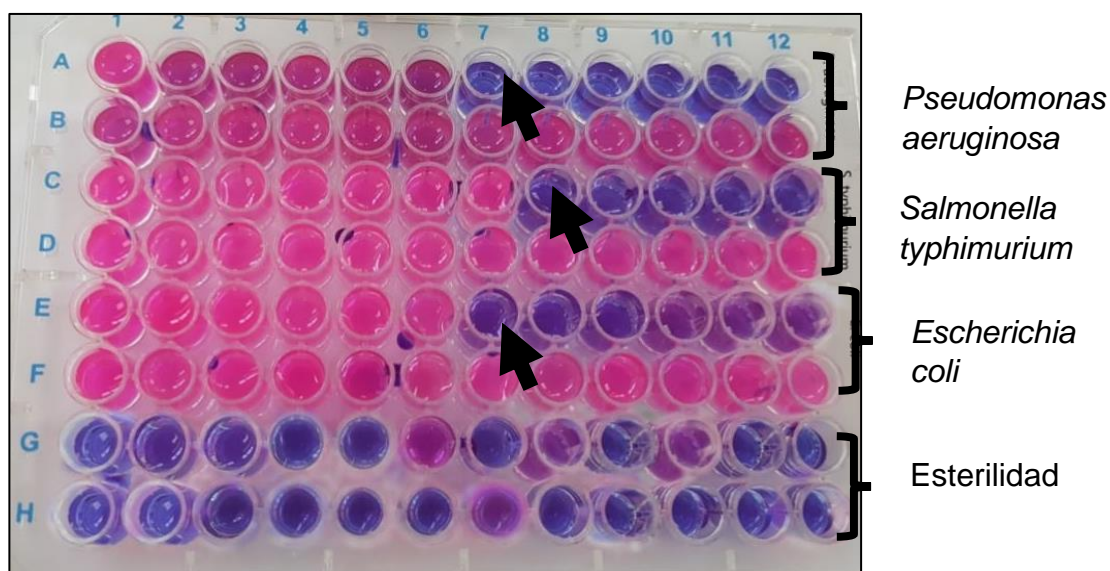


Figura N° 6. Selección de antibiótico como control positivo de inhibición y determinación de su CMI frente a *Pseudomonas aeruginosa* (Fila A-B), *Salmonella typhimurium* (Fila C-D) y *Escherichia coli* (E-F). Fila G-H: control de esterilidad.

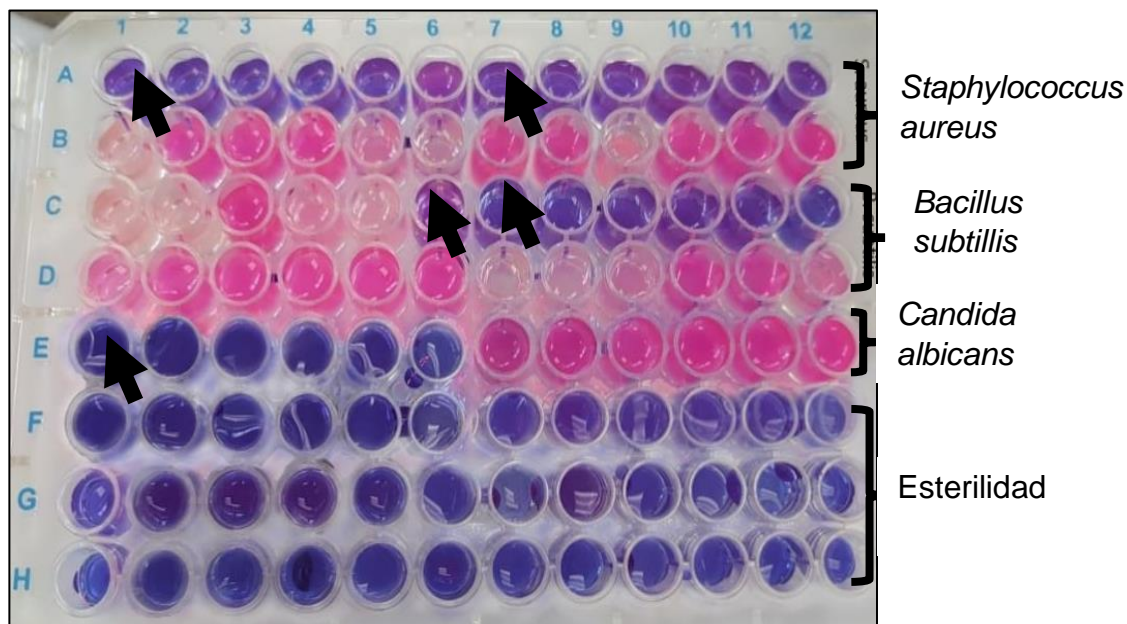


Figura N° 7. Selección de antibiótico y antimicótico como control positivo de inhibición y determinación de su CMI frente a *Staphylococcus aureus* (Filas A-B), *Bacillus subtilis* (Filas B-C) y *Candida albicans* (Fila E). Filas F-H: control de esterilidad. Las flechas indican el pocillo que contiene la Concentración Mínima Inhibitoria.

Para el ensayo de difusión en agar, inicialmente se evaluaron las concentraciones de 125µg/mL, 250µg/mL, 500µg/mL y 1000µg/mL, tomándose como un resultado con efecto antimicrobiano a aquellos pocillos que contenían zona de inhibición, sin embargo, no existió ninguna actividad a estas concentraciones de extractos de propóleos; los controles positivos utilizados sí presentaron zona de inhibición alrededor del pocillo para todos los microorganismos utilizados. En cuanto al medio de dilución para los extractos, dimetilsulfoxido (DMSO) 10%, no presentó ninguna zona de inhibición alrededor de los pocillos. (Ver **figura N° 8 (A)**).

Se evaluaron concentraciones mayores a las planteadas inicialmente, debido a que estas no presentaban un halo de inhibición alrededor del pocillo en la placa, por lo tanto, estas concentraciones fueron 1500µg/mL, 3000µg/mL, 6000µg/mL y

12000 μ g/mL, presentando zona de inhibición sólo los extractos de propóleos de los municipios de Huizúcar, San Salvador frente a *Salmonella enterica serovar typhimurium* ATCC14028 y San Alejo, La Unión frente *Bacillus subtilis subsp. spizizenii* ATCC6633. (Ver figura N° 8 (B)).

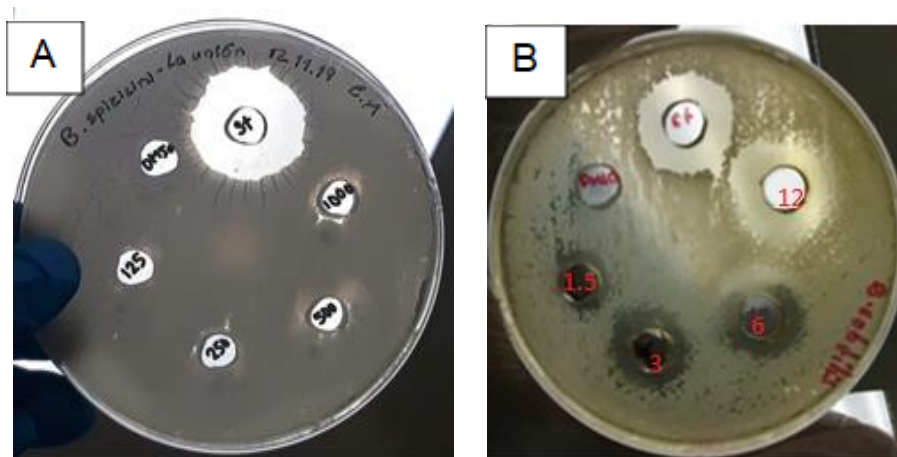


Figura No. 8 (A) Ejemplo de ausencia de zona de inhibición (B) Presencia de zona de inhibición por extracto de propóleos de San Alejo, La Unión frente a *Bacillus subtilis subsp. spizizenii* ATCC 6633. St: Amikacina 2 μ g/mL.

Durante dicho ensayo, se obtuvo zonas de inhibición que oscilaron entre 14mm a 21mm frente *Bacillus subtilis subsp. spizizenii* ATCC 6633. (Ver figura N° 8) mientras que las zonas de inhibición frente a *Salmonella enterica serovar typhimurium* ATCC14028 oscilaron entre 11mm a 19mm (Ver figura N° 9); ambos casos presentaron una proporcionalidad directa entre la zona de inhibición y su concentración de extracto de propóleos correspondiente.

En relación con la actividad antimicrobiana, sólo dos de los extractos evaluados demostraron tener actividad antibacteriana: una bacteria Gram positiva (*Bacillus subtilis subsp. spizizenii*) y una Gram negativa (*Salmonella enterica serovar typhimurium*).

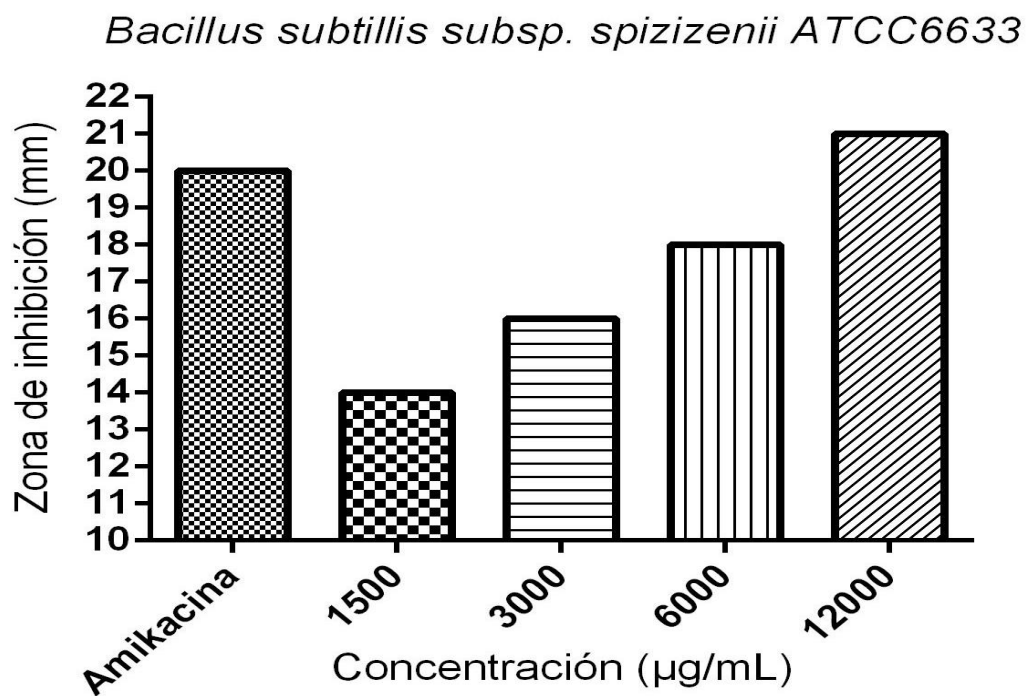


Figura N^o 9. Diámetros de zonas de inhibición producidas por los extractos de propóleos de San Alejo, La Unión. *Amikacina: 2µg/mL

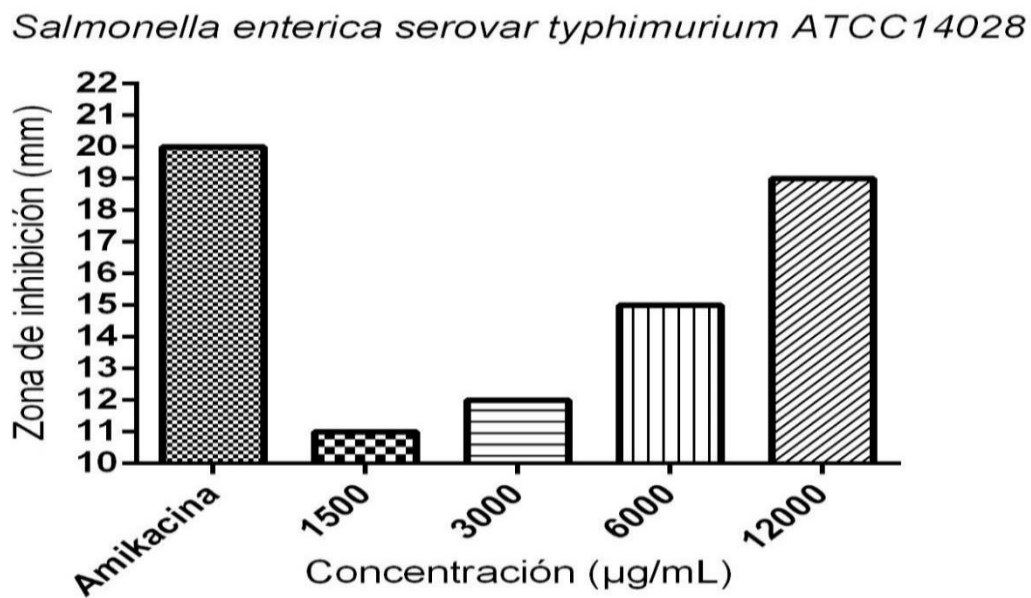


Figura N^o10. Diámetros de zonas de inhibición producidas por los extractos de propóleos de Huizúcar, La Libertad. *Amikacina: 4µg/mL.

Respecto a *Bacillus subtilis* las zonas de inhibición se presentaron a concentraciones mayores a 3000 µg/mL, las cuales corresponden al extracto de propóleos de San Alejo, la Unión, que al mismo tiempo presentó metabolitos como chalconas y triterpenos. Las chalconas son un tipo de flavonoides, por lo que podría atribuírsele el efecto antibacteriano a este tipo de compuestos. La actividad antibacteriana presentada para este extracto de propóleos coincide con el estudio realizado por Martínez- Galán *et al* (2009) ⁽⁴⁰⁾ y por Ristivojević *et al.* (2016) ⁽⁵⁹⁾ donde se reporta la actividad antibacteriana de extractos de propóleos frente a bacterias Gram positivas y Gram negativas, entre ellas *Bacillus subtilis*, la cual se encontraba entre las más sensibles a los extractos estudiados, atribuyéndole estos resultados al contenido fenólico.

En un estudio realizado por Béji-Srairi *et al.* (2020) ⁽⁸⁾ con propóleos de Túnez, África donde se demostró la actividad frente a *Salmonella typhimurium* y *Bacillus subtilis*, en la cual destacaban que la actividad depende del origen de la muestra, la concentración del extracto y la cepa bacteriana. Dicha actividad es atribuida a la presencia de flavonoides, diterpenos, terpenos y ácidos fenólicos que se encuentran en las plantas de mayor abundancia en estas zonas geográficas; aunque su actividad se encontró a concentraciones mucho más bajas, de 250 a 500 µg/mL, que las obtenidas durante el desarrollo de la presente investigación que van de 1500 a 12000 µg/mL. Además, una investigación realizada por Orsi *et al.* (2005) ⁽⁴⁹⁾ demostró que extractos de dos regiones de Brasil presentaron actividad frente a esta bacteria haciendo mención que la actividad puede variar según la región geográfica de donde se extrae la muestra de propóleos.

El extracto de propóleos de Huizúcar, La Libertad demostró actividad antibacteriana frente a *Salmonella typhimurium*, aunque esta se presenta a concentraciones altas, puede atribuírsele este efecto a los metabolitos de tipo flavonoides que al comparar su sensibilidad puede clasificarse entre sensible y

muy sensible, tomando como referencia el estudio realizado por Hadzic et al. (2019) ⁽²⁵⁾ donde se realizó el ensayo de difusión en pozo y proponen una escala de acuerdo al tamaño de la zona de inhibición que se presenta alrededor del pozo que va desde no sensible hasta extremadamente sensible, donde señalan que su extracto etanólico de propóleos en evaluación es sensible frente a dicho microorganismo. Sin embargo, dicho estudio sólo se basa en la zona de inhibición sin contemplar la concentración para dicha clasificación.

Tomando en cuenta la presencia de metabolitos secundarios de tipo flavonoides, chalconas y triterpenos en los propóleos utilizados durante esta investigación, Talero Urrego (2014) ⁽⁷⁴⁾, sugiere que la actividad antimicrobiana de los propóleos depende de sinergismo entre algunos flavonoides, ácidos fenólicos y otros compuestos. Sin embargo, por la alta versatilidad de la composición química de propóleos, no existe una actividad antimicrobiana definida en comparación a los antimicrobianos.

Bucio-Villalobos y Martínez-Jaime (2017) ⁽¹⁰⁾ evaluaron bacterias Gram positivas y Gram negativas, donde reportan ausencia de actividad antimicrobiana sobre *Escherichia coli*. Otras investigaciones realizadas por Silva et al. (2019) ⁽⁶⁶⁾ determinaron que los extractos etanólicos estudiados no mostraron actividad frente a bacterias Gram negativas, por ejemplo, frente a *Pseudomona aeruginosa*, donde asocian esta ausencia de actividad antimicrobiana al origen, composición y la forma de recolección de los propóleos.

En relación con la inactividad frente a *Staphylococcus aureus* en este estudio, podría inferirse que es debido a la ausencia de metabolitos secundarios activos frente a este tipo de microorganismos como lo son algunos flavonoides, que según Souza et al. (2014) ⁽⁶²⁾ asocian que la ausencia de actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* está influenciada por la estacionalidad, el

recolector y su composición química como lo son los flavonoides. De igual forma, Rico López (2017) ⁽⁵⁸⁾ determinó la actividad frente a este Gram positivo donde manifestaron que los distintos orígenes de los propóleos están en relación directa con su composición en sustancias antioxidantes y por tanto con su actividad antimicrobiana. Otros resultados positivos frente a este microorganismo, lo reporta Souza et al. (2014) ⁽⁶⁹⁾ donde afirma que hay una correlación positiva entre el contenido total de flavonoides y la actividad antibacteriana.

La ausencia de actividad frente a *Candida albicans* ha sido reportada por extractos provenientes de Colombia por Bastos et al. (2011) ⁽⁵⁾, así como también por extractos provenientes de Corea y Tailandia, reportados por Chen (2011) ⁽¹⁵⁾ donde algunos de los extractos estudiados no mostraron actividad frente a esta levadura asociándolo al bajo contenido de flavonoides presentes en dichos propóleos. Dicha inactividad frente a esta levadura fue evidenciada en el desarrollo de la presente investigación, que, a pesar de haber existencia de flavonoides en dos muestras, ninguna tuvo actividad frente dicha levadura, posiblemente atribuida a la baja concentración de flavonoides o el tipo de flavonoides presentes pudieran no ser activos frente a este microorganismo.

Es evidente que la diversidad en la composición química en los propóleos se ve influenciada por muchos factores los cuáles están íntimamente relacionados con sus actividades biológicas, generando así una asociación directa entre la presencia de metabolitos secundarios de tipo flavonoides y la actividad antimicrobiana. Sin embargo, se debe considerar las concentraciones a las cuales estos extractos podrían ser activos, ya que Ramírez y Castaño (2009) ⁽⁵⁷⁾ expresan que una buena actividad antimicrobiana debe estar por debajo de 1 mg/mL, para extractos de origen vegetal y así considerar su actividad, pues las concentraciones de antimicrobianos siempre tienden a ser activas a concentraciones mucho más bajas. Si bien este factor debe ser tomado en

cuenta, ya se han reportado concentraciones con actividad antimicrobiana superiores a 1 mg/mL para microorganismos Gram positivos, levaduras y aún más altas para Gram negativos. Sin embargo, durante la presente investigación, las concentraciones a las que se obtuvo actividad antimicrobiana fueron mayores a 1mg/mL y en la mayoría de los casos, no se presentó actividad a pesar de las altas concentraciones, muy probablemente debido a la escasez de metabolitos de tipo flavonoides responsables generalmente de la acción microbicida.

Respecto al ensayo de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), realizado con los extractos de propóleos que presentaron zona de inhibición en el ensayo de difusión en agar donde solo fueron 2 de 10; se obtuvo que, para la cepa *Salmonella entérica serovar typhimurium ATCC14028*, presentó una coloración azul violeta en la columna 6 correspondiente a la concentración 2048µg/mL de extractos de propóleos de Huizúcar, La Libertad, considerándose esta su CMI.

Respecto a los resultados obtenidos en el ensayo de Concentración Mínima Inhibitoria por el método de microdilución en caldo, para *Bacillus subtilis subsp. spizizenii ATCC6633* se obtuvo una coloración azul oscura en la columna 6 correspondiente a la concentración de 4096µg/mL de extractos de propóleos de San Alejo, se obtuvo una CMI de 4096 µg/mL, considerada débil según Wang (2014) ⁽⁷⁸⁾, siendo ésta la mínima concentración a la que el microorganismo es inhibido por el extracto de propóleos. Los resultados de dicho ensayo se evidencian en la **figura N° 11**.

Resultados obtenidos por autores como Mohammadzadeh et al. (2007) ⁽⁴³⁾ reportaron una CMI de 250 µg/mL para bacterias formadoras de esporas, *Bacillus subtilis*, que, aunque es mucho más baja que la encontrada en este estudio, está relacionada a los altos niveles de esteres de cafeína y compuestos de flavonoides. Otro estudio realizado por Chen (2018) ⁽¹⁶⁾ reportaron CMI a

concentraciones bajas de 10 µg/mL para los propóleos extraídos con etanol al 80%.

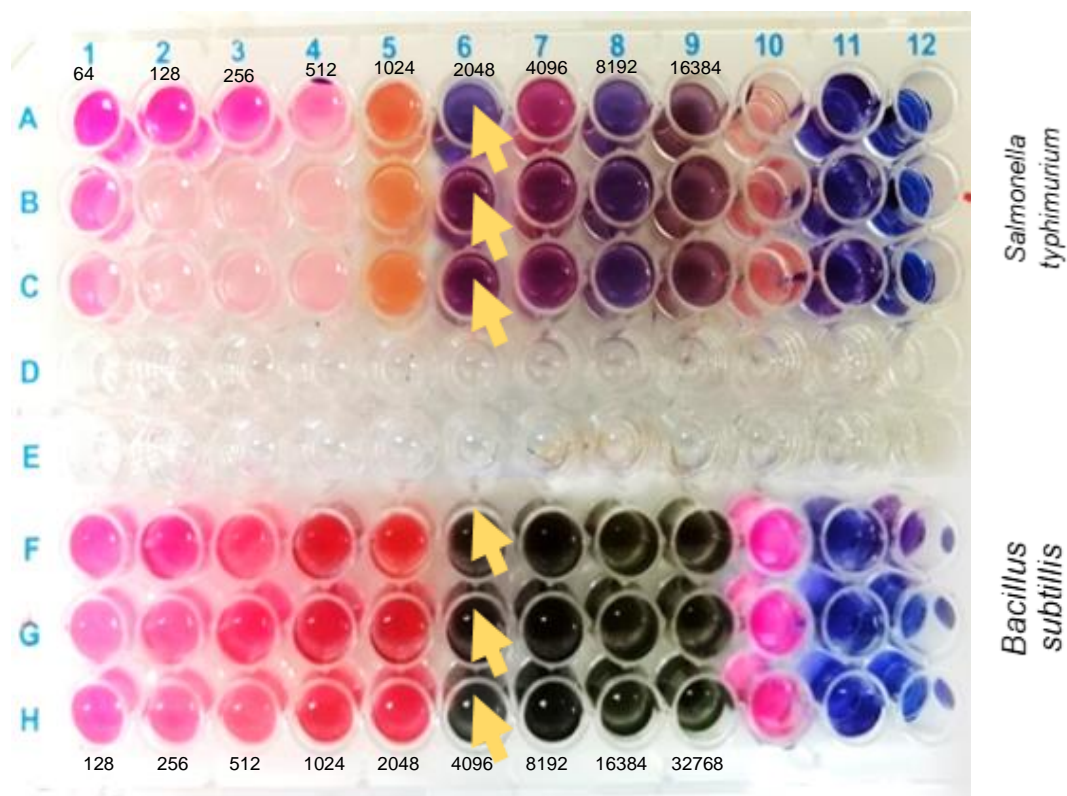


Figura N° 11. Determinación de CMI. (A) Extracto de propóleos de Huizúcar, La Libertad frente a *Salmonella entérica serovar typhimurium* ATCC14028. (B) Extracto de propóleos de San Alejo, La Unión frente a *Bacillus subtilis subsp. spizizenii* ATCC6633.

En cuanto a los resultados de CMI frente a *Salmonella typhimurium*, su inhibición fue a partir de la concentración de 2048 µg/mL de extractos de propóleos de Huizúcar, La Libertad, considerada esta CMI como débil según Wang (2014) ⁽⁷⁸⁾. Sin embargo, es una concentración cercana a la reportada por Talero Urrego (2014) ⁽⁵⁴⁾ donde se reportaron estudios con extractos de propóleos colombianos obtenidos con etanol al 70% y 96%, demostrando valores de CMI para *Salmonella typhimurium* que varían desde 0.8 a 1.6 mg/mL mientras que, para *Bacillus subtilis*, se presentó una CMI de 0.1 mg/mL para todos los extractos, en

los cuales se encontraron diferencias significativas para las extracciones con respecto a la actividad antimicrobiana.

Gomes et al. (2016) ⁽²⁴⁾ reportó valores de CMI que van desde 2.25 a 18.5 mg/mL para Gram positivas y 4.5 a 18.9 mg/mL para Gram negativas con extractos de propóleos color marrón al 35%, procedentes de Brasil, mientras que Pérez et al. (2020) ⁽⁵³⁾ reportan estudios con propóleos mexicanos de diferentes regiones con resultados de CMI que van desde 0.19 mg/mL hasta 30 mg/mL, para bacterias Gram positivas y de 3.75 mg/mL a 15 mg/mL para Gram negativas, sin embargo, reportaron cantidades elevadas de flavonoides que daban la mejor actividad sobre estas bacterias, pero se reportaban otros propóleos que contenían una baja cantidad de estos compuestos y, en consecuencia, su actividad se veía disminuida.

Por tanto al comparar la actividad antimicrobiana con respecto a todas sus características físico químicas las muestras que presentaron una actividad antimicrobiana fueron los únicos dos en presentar compuestos de tipo flavonoides, donde destaca que los propóleos de la Unión fueron los únicos que presentaron una coloración café verdosa, y presentó en su composición química flavonoides que al observarse en CCF, se observó la diversidad de compuestos, que como se ha mencionado son estos los responsables de ejercer la acción antimicrobiana y se puede correlacionar ya que fue 1 de los dos extractos que presento una actividad frente a una bacteria Gram positiva.

En cuanto al propóleos de Huizúcar en su análisis físico químico, su análisis organoléptico fue similar al resto de muestras, pero al hacer el estudio químico fue el único en presentar metabolitos de tipo chalconas que son un tipo de flavonoides, donde podemos evidenciar una acción antimicrobiana sobre una gran negativa, muy probablemente a la presencia de este tipo de metabolito de

tipo chalconas.

El resto de las muestras no presentaron una actividad frente a los microorganismos evaluados, así como también no presentaron la presencia de flavonoides en su composición, a pesar de que sus características organolépticas eran muy similares, pero si la presencia de otro tipo de compuestos, probablemente sin actividad antimicrobiana frente a estos microorganismos, lo que sugiere que la actividad está íntimamente ligada a la existencia de metabolitos secundarios de tipo flavonoide.

Para el ensayo de curva de muerte, se evaluaron tiempos de 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 y 26 horas, por el método de la microgota y estos resultados se muestran en las figuras N°11 y N°12.

Salmonella enterica serovar typhimurium ATCC14028

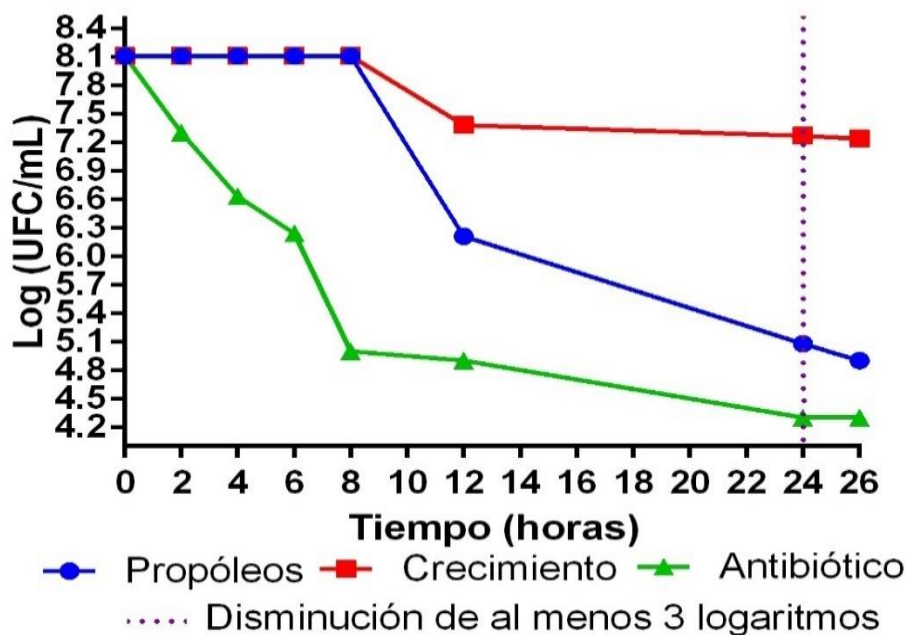


Figura N° 12. Curva de muerte *Salmonella entérica serovar typhimurium ATCC14028*.

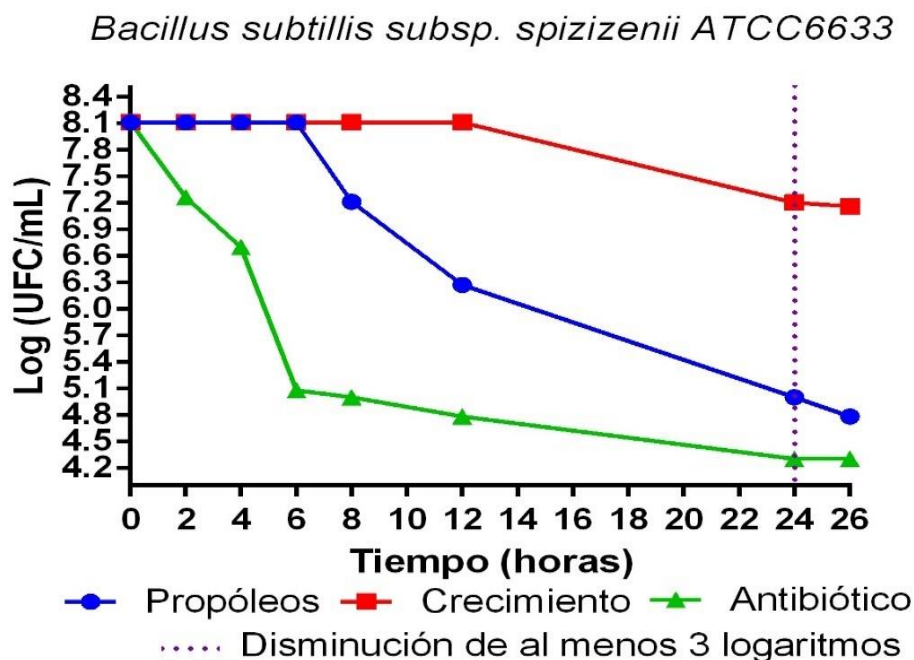


Figura N^a 13. Curva de muerte *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* ATCC6633.

Ambos microorganismos presentaron disminución de al menos 3 logaritmos a las 24 horas con los extractos de propóleos correspondientes, mientras que, con el control positivo antibiótico, *Salmonella typhimurium* presentó dicha disminución a las 8 horas y *Bacillus subtilis* a las 6 horas, con la metodología usada.

El ensayo de curva de muerte permitió definir a qué tiempo la Concentración Mínima Inhibitoria de cada extracto de propóleos frente a su respectivo microorganismo presentaría una disminución de al menos 3 logaritmos de sus concentraciones bacterianas en UFC/mL para declarar muerte bacteriana. (52)

Comparado con el estudio realizado por Orsi et al. (2005) (49) donde demostró que después de 14 horas lograban un efecto inhibitor sobre cepas del género *Salmonella* y que después de 24 horas se lograba el efecto bactericida llevando el porcentaje de supervivencia casi a cero.

De acuerdo con Kalia et al. (2017) ⁽³⁰⁾, en estudios de diferentes propóleos y diferentes solventes extractores, los extractos etanólicos demostraron tener la mejor CMI de 160 mg/mL, con una curva de muerte donde se observó una reducción significativa después de 12 y 24 horas demostrando que los extractos de propóleos etanólicos son los que tienen mejores resultados respecto a otro tipo de extracto.

Para evidenciar el daño celular se realizó el ensayo con el extracto de propóleos de Huizúcar, La Libertad a una concentración de 2048µg/mL frente *Salmonella typhimurium* mientras que, el extracto de San Alejo, La Unión a una concentración 4096µg/mL, frente *Bacillus subtilis*.

Para cada evaluación, para efectos de comparación, se preparó el control positivo de inhibición con antibiótico y el control de crecimiento. La figura 14 muestra micrografías electrónicas de barrido de células bacterianas de *Salmonella typhimurium* y *Bacillus* tratadas con antibiótico, extracto de propóleos y su respectivo control de crecimiento. En ambos casos se observa una morfología muy bien definida en el control de crecimiento, presentándose *Salmonella typhimurium* en forma de bacilos cortos gruesos. (figura 9 (A)) y *Bacillus subtilis* en forma de bacilos largos (figura 9 (D)). Ambos microorganismos al ser tratados con amikacina, como control de inhibición, perdieron su morfología inicial dando como resultado agregados celulares sin una forma definida (figura 9 (B) y (E)).

De la misma manera, ambos microorganismos perdieron su morfología inicial característica al ser tratados con los extractos de propóleos, presentando *Bacillus subtilis* agregados amorfos con superficie lisa mientras que *Salmonella typhimurium* presentó aglomerados amorfos con una superficie rugosa (figura 9 (C) y (F)).

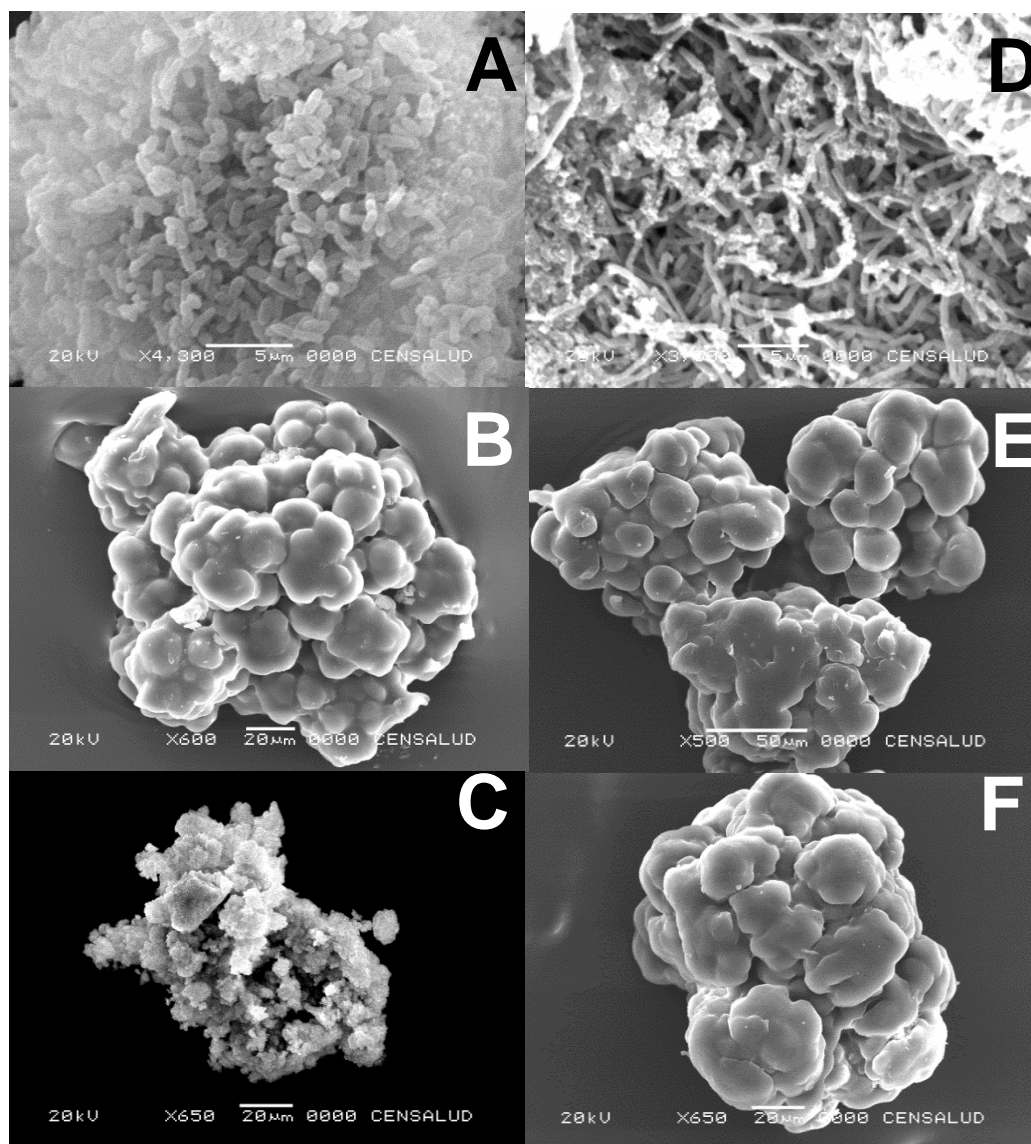


Figura 14. Micrografías electrónicas de barrido de: (A) *Salmonella typhimurium* sin tratamiento (ampliación: x3500), (B) *Salmonella typhimurium* con amikacina (ampliación: x600), (C) *Salmonella typhimurium* con extracto de propóleos de Huizúcar, La Libertad (ampliación: x650), (D) *Bacillus subtilis* sin tratamiento (ampliación: x4000), (E) *Bacillus subtilis* con amikacina (ampliación: x500), (F) *Bacillus subtilis* con extracto de propóleos de San Alejo, La Unión (ampliación x650).

Los resultados de esta investigación, obtenidos en el ensayo de microscopía electrónica de barrido son comparables con el estudio realizado por O'Driscoll et al. (2013) ⁽⁴⁶⁾ donde se realizaron observaciones de bacterias Gram negativas

tratadas con una molécula con actividad antibiótica, obteniendo como resultado agregación de células bacterianas luego de ser expuestas a su CMI. Dichas observaciones sugieren que se conduce a la inhibición de la formación de la pared celular lateral. Los posibles objetivos incluyen el sistema citoesquelético Mre (proteínas MreB, MreC y MreD) o la enzima PBP2, los cuales son esenciales para la síntesis lateral de peptidoglicanos y el alargamiento de la célula bacteriana. Tanto el sistema Mre como el PBP2 están anclados a la membrana citoplásmica y serían vulnerables a cualquier cambio conformacional inducido por el cualquier agente antibiótico que tenga acción en este lugar.

Por lo tanto, al comparar con los resultados obtenidos durante la presente investigación, existe una similitud en las micrografías obtenidas, donde se perdió su forma de bastón y cambió a una forma esférica cambiando por completo su morfología microscópica, dándose el agrupamiento de estas células y formándose estructuras más grandes hasta obtener agregados celulares O'Driscoll et al. (2013) ⁽⁴⁶⁾ también reportan observaciones en SEM donde se evidenciaba la alteración tanto de la morfología celular así como de la agregación celular para bacterias Gram negativas y Gram positivas, sugiriendo que éste era el resultado por el mecanismo a través del cual funcionaban los compuestos estudiados. Por tanto, en este estudio puede atribuirse hipotéticamente, la agregación de células bacterianas tanto para *Salmonella typhimurium* como para *Bacillus subtilis* como el posible mecanismo por el cual actúan los propóleos, sin embargo, no puede confirmarse un mecanismo de acción debido a la diversidad de metabolitos secundarios que éstos tienen.

En cuanto a lo observado en el tratamiento con amikacina para ambos microorganismos, se observa la agregación de células bacterianas y según lo reportado por Bandera et al. (1998) ⁽⁴⁾ el mecanismo de acción de este antibiótico dentro de la bacteria, es la unión de manera irreversible a la subunidad 30S del

ribosoma, produciéndose una lectura errónea del código genético por el ARN mensajero e incorporación incorrecta de los aminoácidos a la cadena polipeptídica de la bacteria en crecimiento, lo que genera proteínas anormales, trastornos en el metabolismo celular y muerte de la bacteria, por tanto acorde a lo observado en este estudio, una hipótesis sobre el mecanismo de acción es la deformación completa de las bacterias y así causaría la agregación celular en ambas bacterias, y valdría la pena realizar más estudios para determinar a profundidad sobre dicho y efecto y realizar otras pruebas para tener una conclusión más precisa sobre el posible efecto tanto para la actividad del antibiótico como para los extractos de propóleos en estudio.

Los resultados presentados, demuestran que los propóleos de algunas regiones de El Salvador presentan actividad antimicrobiana *in vitro* donde cada una destaca por su diferente composición química, así como por sus características organolépticas predominantes que se ve influenciado por diferentes factores ya mencionados.

Mediante el proceso experimental se ha permitido evidenciar cada una de las características de las muestras de propóleos y la variación de éstas lo cual está directamente relacionado con la flora circundante a la colmena de obtención y esta misma con la composición química variada y la actividad antimicrobiana que éstos pueden ejercer frente a diferentes tipos de microorganismos. Aunque existió actividad antimicrobiana de algunos extractos a concentraciones altas, podría estar ligado a la baja concentración de metabolitos secundarios activos frente a estos microorganismos y su inactividad a la ausencia de metabolitos activos frente a éstos.

CAPITULO VI

CONCLUSIONES

6.0 CONCLUSIONES

1. Las diferentes muestras de propóleos presentaron características organolépticas variadas, que van desde color café hasta un color gris (en su mayoría color café con diferentes tonalidades y sólo una de ella gris), con aspecto entre masas irregulares con poco brillo y de trozos irregulares opacos; con olores de resinoso suave y resinoso muy aromático, una consistencia que va de blanda a dura y con sabor insípido en la totalidad de las muestras.
2. El porcentaje de rendimiento de los extractos de propóleos obtenidos mediante la metodología aplicada se encontró entre el intervalo de 9.31% a 42.65%.
3. Del total de 10 muestras evaluadas en su composición química, 9 muestras presentaron triterpenos, 2 muestras presentaron chalconas, 3 muestras presentaron diterpenos, 1 muestra presentó flavonoides y ninguna muestra presentó cumarinas.
4. La evaluación de los extractos etanólicos de propóleos frente a 6 microorganismos, sólo los extractos correspondientes a Huizúcar, La Libertad y San Alejo, La Unión presentaron actividad antimicrobiana frente a *Salmonella enterica serovar typhimurium* ATCC14028 y *Bacillus subtilis subsp. spizizenii* ATCC6633, respectivamente, atribuyendo dicha actividad a la presencia de flavonoides.
5. La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) para los extractos de propóleos de Huizúcar, La Libertad frente *Salmonella entérica serovar typhimurium* ATCC14028 y San Alejo, La Unión frente a *Bacillus subtilis subsp. Spizizenii*

ATCC6633 fueron de 2048 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 4096 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente.

6. Al visualizar al microscopio electrónico de barrido, ambos microorganismos perdieron su morfología inicial característica al ser tratados con los extractos de propóleos, presentando *Bacillus subtilis* agregados amorfos con superficie lisa mientras que *Salmonella typhimurium* presentó aglomerados amorfos con una superficie rugosa.
7. Los propóleos de El Salvador presentaron variedad de metabolitos secundarios y características organolépticas a las cuales pueden estar ligadas sus propiedades biológicas, siendo probablemente los flavonoides los responsables de la actividad antimicrobiana y de la pérdida de morfología característica microbiana.

CAPITULO VII

RECOMENDACIONES

7.0 RECOMENDACIONES

En futuras investigaciones:

1. Realizar la recolección de muestras de propóleos crudos personalmente por los investigadores que seguirán realizando más estudios sobre estos, para conocer las condiciones en las cuales son producidos y obtenidos.
2. Realizar una inspección de las especies vegetales circundantes a las colmenas de donde provienen las muestras a estudiar, para determinar si se ve influenciada las características fisicoquímicas y microbiológicas.
3. Realizar otros parámetros fisicoquímicos y microbiológicos a las muestras de propóleos crudos contemplados en la Norma Salvadoreña Obligatoria: Calidad de propóleo crudo NSO 65.19.02:03 como humedad, mezclas mecánicas, índices de oxidación, impurezas, contenido de plomo, recuento de bacterias mesófilas, coliformes fecales y totales, *Staphylococcus aureus* y hongos.
4. Realizar estudios de aislamiento y elucidación estructural de los diferentes metabolitos secundarios presentes en los extractos de propóleos analizados en este estudio para determinar cuáles son los responsables del efecto antimicrobiano.
5. Realizar un estudio más exhaustivo incluyendo una TEM para poder determinar de manera más precisa el posible efecto que causan los extractos de propóleos sobre la célula bacteriana y determinar si afecta directamente inhibiendo la formación de la pared celular lateral y corroborar si esto causa el agrupamiento de células y forma estructuras más grandes hasta obtener agregados celulares.

BIBLIOGRAFIA

1. Alday, E., Navarro-Navarro, M., Garibay-Escobar, A., Robles-Zepeda, R., Hernandez, J., & Velazquez, C. (2016). Advances in pharmacological activities and chemical composition of propolis produced in Americas. *Beekeeping and Bee Conservation—Advances in Research*.
2. Angulo Vaca, J. B. (2014). Caracterización y actividad antioxidante de propóleos de diferentes zonas apícolas de la provincia de Chimborazo utilizados en la empresa apicare-riobamba.
3. Ashour, A. A., Raafat, D., El-Gowell, H. M., & El-Kamel, A. H. (2015). Green synthesis of silver nanoparticles using cranberry powder aqueous extract: characterization and antimicrobial properties. *International journal of nanomedicine*, 10, 7207.
4. Bandera, R. C., Imbert, I. C., Bandera, F. C., & Sierra, R. E. (1998). Amikacina. *Revista Información Científica*, 17(1).
5. Bankova, V., Bertelli, D., Borba, R., Conti, B. J., da Silva Cunha, I. B., Danert, C., & Papotti, G. (2019). Standard methods for *Apis mellifera* propolis research. *Journal of Apicultural Research*, 58(2), 1-49.
6. Bastos, E. M. A. F., Guzmán, D., Figueroa, J., Tello, J., & Scoaris, D. de O. (2011). Antimicrobial and physico-chemical characterization of propolis of *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) from the Colombian Andes. *Acta Biológica Colombiana*, 16(1), 175–184.
7. Bayram, N. E., Sorkun, K., Oz, G. C., Salih, B., & Topcu, G. (2018). Chemical

characterization of 64 propolis samples from hakkari, Turkey.

8. Béji-Srairi, R., Younes, I., Snoussi, M., Yahyaoui, K., Borchard, G., Ksouri, R., & Wided, M. K. (2020). Ethanolic extract of Tunisian propolis: chemical composition, antioxidant, antimicrobial and antiproliferative properties. *Journal of Apicultural Research*, 1-11.
9. Borges, A., Ferreira, C., Saavedra, M. J., & Simoes, M. (2013). Antibacterial activity and mode of action of ferulic and gallic acids against pathogenic bacteria. *Microbial drug resistance*, 19(4), 256-265.
10. Bucio-Villalobos, C. M., & Martínez-Jaime, O. A. (2017). Actividad antibacteriana de un extracto acuoso de propóleo del municipio de Irapuato, Guanajuato, México. *Agronomía Mesoamericana*, 28(1), 223-227.
11. Campo, N. B., Ortega, N. S., & Fajardo, F. C. (2011). Actividad antibacteriana y composición cualitativa de propóleos provenientes de dos zonas climáticas del Departamento del Cauca. *Biotecnología en el sector Agropecuario y Agroindustrial*, 9(1), 8-16.
12. Campos, J. V. de, Assis, O. B. G., & Bernardes-Filho, R. (2020). Atomic force microscopy evidences of bacterial cell damage caused by propolis extracts on *E. coli* and *S. aureus*. *Food Science and Technology*, 40(1), 55–61.
13. Carrillo, M. L., Castillo, L. N., & Mauricio, R. (2011). Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos de la Huasteca Potosina (México). *Información tecnológica*, 22(5), 21-28.
14. Chaillou, L. L., Herrera, H. A., & Maidana, J. F. (2004). Estudio del propóleos

- de Santiago del Estero, Argentina. *Food Science and Technology*, 24(1), 11-15.
15. Chen, L. (2011). Extraction and antioxidant properties of propolis from China, Korea and Northern Thailand. Chulalongkorn University.
16. Chen, Y. W., Ye, S. R., Ting, C., & Yu, Y. H. (2018). Antibacterial activity of propolis from Taiwanese green propolis. *Journal of Food and Drug Analysis*, 26(2), 761–768.
17. CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) et al. (2003). Calidad de propóleo crudo. Norma salvadoreña (NSO 65.19.02:03). Diario Oficial. San Salvador. El Salvador.
18. Cuadra Zelaya, T. E., & Molina Velásquez, N. E. (2018). Manual Ilustrado de Microbiología Farmacéutica.
19. Dantas Silva, R. P., Machado, B. A. S., Barreto, G. de A., Costa, S. S., Andrade, L. N., Amaral, R. G., Carvalho, A. A., Padilha, F. F., Barbosa, J. D. V., & Umsza-Guez, M. A. (2017). Antioxidant, antimicrobial, antiparasitic, and cytotoxic properties of various Brazilian propolis extracts. *Plos One*, 12(3).
20. Deriu, E., Liu, J. Z., Pezeshki, M., Edwards, R. A., Ochoa, R. J., Contreras, H., Libby, S. J., Fang, F. C., & Raffatellu, M. (2013). Probiotic Bacteria Reduce *Salmonella typhimurium* Intestinal Colonization by Competing for Iron. *Cell Host & Microbe*, 14(1), 26-37.
21. Fabrega, A., & Vila, J. (2013). *Salmonella enterica serovar typhimurium* Skills to Succeed in the Host: Virulence and Regulation. *Clinical Microbiology*

Reviews, 26(2), 308-341.

22. Flores Amaya, K. C., & Rodríguez Lemus, B. L. (2017). Análisis fitoquímico preliminar de los extractos orgánicos de *Maytenus segoviarum*, *Quetzalia reynae* y *Zinowiewia integerrima* de la familia Celastraceae pertenecientes a la flora salvadoreña, Universidad de El Salvador.
23. Galindo, N. J. P., Suárez, G. A. P., & Guerrero, S. R. C. (2016). Análisis proximal y fisicoquímico de propóleos (propolis) provenientes de apiarios boyacenses. *Bistua Revista De La Facultad De Ciencias Básicas*, 14(2), 126-140.
24. Gomes, M. F. F., Ítavo, C. C. B. F., Leal, C. R. B., Ítavo, L. C. V., & Lunas, R. C. (2016). Atividade antibacteriana in vitro da própolis marrom. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, 36(4), 279–282.
25. Hadzic, V., Jerkovic-Mujkic, A., Husejnagic, D., Bacic, A. (2019); Antibacterial activity of various oils and ethanol extract propolis against Gram positive and Gram negative bacteria. *Int. J. of Adv. Res.* 7 (Oct). 141-147].
26. Hernandez Mancía, S. G., & Morataya Gonzalez, M. A. (2017). Análisis fitoquímico y determinación de metales pesados, minerales y oligoelementos, en plantas medicinales comercializadas en el mercado central de San Salvador. Universidad de El Salvador.
27. Institute, C. L. S. (2012). *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standards—Ninth Edition.*
28. Isla, M. I., Moreno, M. N., Sampietro, A. R., & Vattuone, M. A. (2001).

Antioxidant activity of Argentine propolis extracts. *Journal Of Ethnopharmacology*, 76(2), 165-170.

29. Joya, M., Gil, M., & Bastidas-Pacheco, G. (2017). Actividad fungistática y fungicida de extractos etanólicos de propóleos sobre el crecimiento in vitro de cepas del género *Candida*. *Revista Tecnología en Marcha*, 30(3), 3.
30. Kalia, P., Kumar, N. R., & Harjai, K. (2017). Efficacy of different extracts of propolis against *Salmonella enterica serovar typhimurium*: *In vitro* and *in vivo* study. *Journal of Applied and Natural Science*, 9(1), 144-149.
31. Krell, R. (1996). Value-added products from beekeeping (No. 124). Food & Agriculture Organization.
32. Kujumgiev, A., Tsvetkova, I., Serkedjieva, Y., Bankova, V., Christov, R., & Popov, S. (1999). Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *Journal of ethnopharmacology*, 64(3), 235-240.
33. Lagos Talaverano, D., & Quinto Ancieta, R. E. (2018). Efecto antibacteriano del extracto etanólico de las hojas de *muehlenbeckia volcánica* (benth.) endl.(mullaca) en cepas de *Staphylococcus aureus ATCC6538*, *in vitro*.
34. Lemus Aguilar, L. F. (2015). Determinación de la concentración inhibitoria mínima de extractos de *Rosmarinus officinalis L.* (Romero) sobre *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM). Universidad de El Salvador.
35. López, A. & Subovsky, M. & Maidana, J.F. & Castillo, A. (2003). Short communication: organoleptic and pshysical characteristics of propolis from

Northeastern Argentina. Spanish Journal of Agricultural Research.

36. Lorian, V. (2005). Antibiotics in laboratory medicine. Lippincott Williams & Wilkins.
37. Lozina, L. A., Peichoto, M. E., Acosta, O. C., & Granero, G. E. (2010). Estandarización y Caracterización Organoléptica y Físico-Química de 15 Propóleos Argentinos. Latin American Journal of Pharmacy, 29(1), 102-10.
38. Marisa, B. (2013). Candidiasis. Centro de Referencia de Micología.
39. Marius, S., Lucian, H., Marius, M., Daniela, P., Irina, G., Romeo-Iulian, O., Simona, D., & Viorel, M. (2011). Enhanced antibacterial effect of silver nanoparticles obtained by electrochemical synthesis in poly (amide-hydroxyurethane) media. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 22(4), 789.
40. Martínez Galán, J. P. (2009). Caracterización físico-química y evaluación de la actividad antifúngica de propóleos recolectados en el suroeste antioqueño. Facultad de Ciencias Agropecuarias.
41. Mirzoeva, O. K., Grishanin, R. N., & Calder, P. C. (1997). Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. Microbiological research, 152(3), 239-246.
42. Miyataka H, Nishiki M, Matsumoto H, Fujimoto T, Matsuka M, Satoh T. Evaluation of propolis I. Evaluation of Brazilian and Chinese propolis by enzymatic and physico-chemical methods. Biol Pharm Bull. 1997; 20 (5): 496-501.

43. Mohammadzadeh, S., Shariatpanahi, M., Hamed, M., Ahmadkhaniha, R., Samadi, N., & Ostad, S. N. (2007). Chemical composition, oral toxicity and antimicrobial activity of Iranian propolis. *Food Chemistry*, 103(4), 1097–1103. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.10.006>.
44. Nakamura, L. K., Roberts, M. S., & Cohan, F. M. (s. f.). Relationship of *Bacillus subtilis* clades associated with strains 168 and W23: A proposal for *Subtilis subsp. Nov*, and *Bacillus subtilis subsp. Spizizenii*, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 5.
45. Noushin Aminimoghadamfarouj, & Alireza Nematollahi. (2017). Propolis Diterpenes as a Remarkable Bio-Source for Drug Discovery Development: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(6), 1290.
46. O'Driscoll, N. H., Labovitiadi, O., Cushnie, T. T., Matthews, K. H., Mercer, D. K., & Lamb, A. J. (2013). Production and evaluation of an antimicrobial peptide-containing wafer formulation for topical application. *Current microbiology*, 66(3), 271-278.
47. Ordoñez Checa, F. S. (2012). Métodos de Purificación del Propoleo para su Posterior Aplicación en Sanidad Animal.
48. Orsi, R. D. O., Sforcin, J. M., Funari, S. R. C., Fernandes, A., Rodrigues, P., & Bankova, V. (2007). Effects of propolis from Brazil and Bulgaria on *Salmonella* serovars. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 13(4), 748–757.
49. Orsi, R. O., Sforcin, J. M., Rall, V. L. M., Funari, S. R. C., Barbosa, L., &

- Fernandes, J. R. (2005). Susceptibility profile of Salmonella against the antibacterial activity of propolis produced in two regions of Brazil. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 11(2), 109-116.
50. Ortega, N., Benítez Campo, N., & Cabezas-Fajardo, F. (2011). Antibacterial activity and cualitative composition propolis from two climatic regions Cauca department. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 9, 8-16.
51. Park, Y. K., & Ikegaki, M. (1998). Preparation of water and ethanolic extracts of propolis and evaluation of the preparations. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 62(11), 2230-2232.
52. Pearson, R. D., Steigbigel, R. T., Davis, H. T., & Chapman, S. W. (1980). Method of reliable determination of minimal lethal antibiotic concentrations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 18(5), 699-708.
53. Pérez, B. R., Martínez, M. M. C., Carrillo, J. G. P., & Sánchez, T. A. C. (2020) Chemical composition, antioxidant properties and antimicrobial activity of Mexican propolis.
54. Pineda, E. B., Alvarado, E. L. de, & Hernández de Canales, F. (1994). *Metodología de la investigación: Manual para el desarrollo de personal de salud*. Organización Panamericana de la Salud: Organización Mundial de la Salud.
55. Popova, M., Bankova, V., Spassov, S., Tsvetkova, I., Silva, M. V., Tsartsarova, M., & Naydenski, C. (2001). New bioactive chalcones in propolis from El Salvador. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 56(7-8), 593-596.

56. Popova, M., Bankova, V., Tsvetkova, I., Naydenski, C., & Silva, M. V. (2001). The first glycosides isolated from propolis: Diterpene rhamnosides. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 56(11-12), 1108-1111.
57. Ramirez, L. S., & Castaño, D. M. (2009). Metodologías para evaluar *in vitro* la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et Technica*, 15(42), 263-268.
58. Rico López, E. (2017). Optimización de un método de obtención de extracto etanólico de propóleo en base al poder antimicrobiano.
59. Ristivojević, P., Dimkić, I., Trifković, J., Berić, T., Vovk, I., Milojković-Opsenica, D., & Stanković, S. (2016). Antimicrobial activity of Serbian propolis evaluated by means of MIC, HPTLC, bioautography and chemometrics. *PloS one*, 11(6), e0157097.
60. Romero Rivera, M. H. (2017). Interacciones entre compuestos mayoritarios anti-*Helicobacter pylori* presentes en propóleos de la Región del BioBío. Universidad de Concepción. Facultad de Ciencias Biológicas. Departamento de Microbiología.
61. Rufatto, L. C., dos Santos, D. A., Marinho, F., Henriques, J. A. P., Roesch Ely, M., & Moura, S. (2017). Red propolis: Chemical composition and pharmacological activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7(7), 591-598.
62. Ryan, K. J., & Ray, C. G. (Eds.). (2016). *Microbiología médica*: Sherris. McGraw-Hill Interamericana.

63. Salamanca Grosso, G. (2017). Origen, naturaleza, propiedades fisicoquímicas y valor terapéutico del propóleo. Sello Editorial Universidad del Tolima.
64. Salmón, V. N., & Martín, E. R. (s. f.). El propóleo, otro recurso terapéutico en la práctica clínica. 28.
65. Sharapin, N. (2000). Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos (Vol. 78). Convenio Andres Bello.
66. Silva, F. R. G., Matias, T. M. S., Souza, L. I. O., Matos-Rocha, T. J., Fonseca, S. A., Mousinho, K. C., & Santos, A. F. (2019). Phytochemical screening and in vitro antibacterial, antifungal, antioxidant and antitumor activities of the red propolis Alagoas. *Brazilian Journal of Biology*, 79(3), 452-459.
67. Singh, Y., Saxena, A., Kumar, R., & Saxena, M. K. (2018). Virulence System of *Salmonella* with Special Reference to *Salmonella enterica*. *Salmonella: A Re-emerging Pathogen*, 41.
68. Sirsat, S. A., Burkholder, K. M., Muthaiyan, A., Dowd, S. E., Bhunia, A. K., & Ricke, S. C. (2011). Effect of sublethal heat stress on *Salmonella Typhimurium* virulence: Heat stress on *Salmonella Typhimurium* virulence. *Journal of Applied Microbiology*, 110(3), 813-822.
69. Souza, E. A. de, Inoue, H. T., Fernandes Júnior, A., Veiga, N., & Orsi, R. D. O. (2014). Influence of seasonality and production method on the antibacterial activity of propolis. *Acta Scientiarum. Animal Sciences*, 36(1), 49.
70. Šturm, L., & Ulrih, N. P. (2019). Advances in the Propolis Chemical

Composition between 2013 and 2018: A Review. *eFood*, 1(1), 24-37.

71. Swanson, S. J., Snider, C., Braden, C. R., Boxrud, D., Wünschmann, A., Rudroff, J. A., Lockett, J., & Smith, K. E. (2007). Multidrug-Resistant *Salmonella enterica* Serotype *Typhimurium* Associated with Pet Rodents. *New England Journal of Medicine*, 356(1), 21-28.
72. Takaisi-Kikuni, N. B., & Schilcher, H. (1994). Electron microscopic and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance. *Planta Medica*, 60(03), 222-227.
73. Talaro, K., & Talaro, A. (1993). *Foundations in microbiology*. Wm. C. Brown Publishers, Dubuque, IA Google Scholar (b) Cerecetto, H, Gonzalez, M. (2002) Chemotherapy of Chagas' disease: status and new developments. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2, 1187-1213.
74. Talero Urrego. C. A. (2014). Actividad anti-gérmenes in vitro de extractos etanólicos de propóleos obtenido de abejas (*Apis mellifera*) en tres áreas geográficas de Colombia. (Tesis Maestría). Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. Universidad Nacional de Colombia.
75. Valgas, C., Souza, S. M. de, Smânia, E. F. A., & Smânia Jr., A. (2007). Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38(2), 369-380.
76. Vilorio B., J. D., Gil G., J. H., Durango R., D. L., & García P., C. M. (2012). Caracterización fisicoquímica del propóleo de la Región Del Bajo Cauca Antioqueño (Antioquia, Colombia). *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 10, 77-86.

77. Wagh, V. D. (2013). Propolis: A Wonder Bees Product and Its Pharmacological Potentials. *Advances in Pharmacological Sciences*, 2013, 1-11.
78. Wang, Y. C. (2014). Medicinal plant activity on *Helicobacter pylori* related diseases. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 20(30), 10368.
79. Wiegand, I., Hilpert, K., & Hancock, R. E. W. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*, 3(2), 163-175.
80. Woisky, R. G., & Salatino, A. (1998). Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *Journal of apicultural research*, 37(2), 99-105.
81. Yang, H. Y., Chang, C. M., Chen, Y. W., & Chou, C. C. (2006). Inhibitory effect of propolis extract on the growth of *Listeria monocytogenes* and the mutagenicity of 4-nitroquinoline-N-oxide. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(6), 937-943.
82. Zagaceta García, J. F. (2017). Actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de hojas de *Chamaesyce thymifolia* frente a cepas bacterianas por los métodos de difusión en agar y macrodilución. Iquitos, 2017. Universidad Nacional de La Amazonia Peruana.

ANEXOS

ANEXO N°1

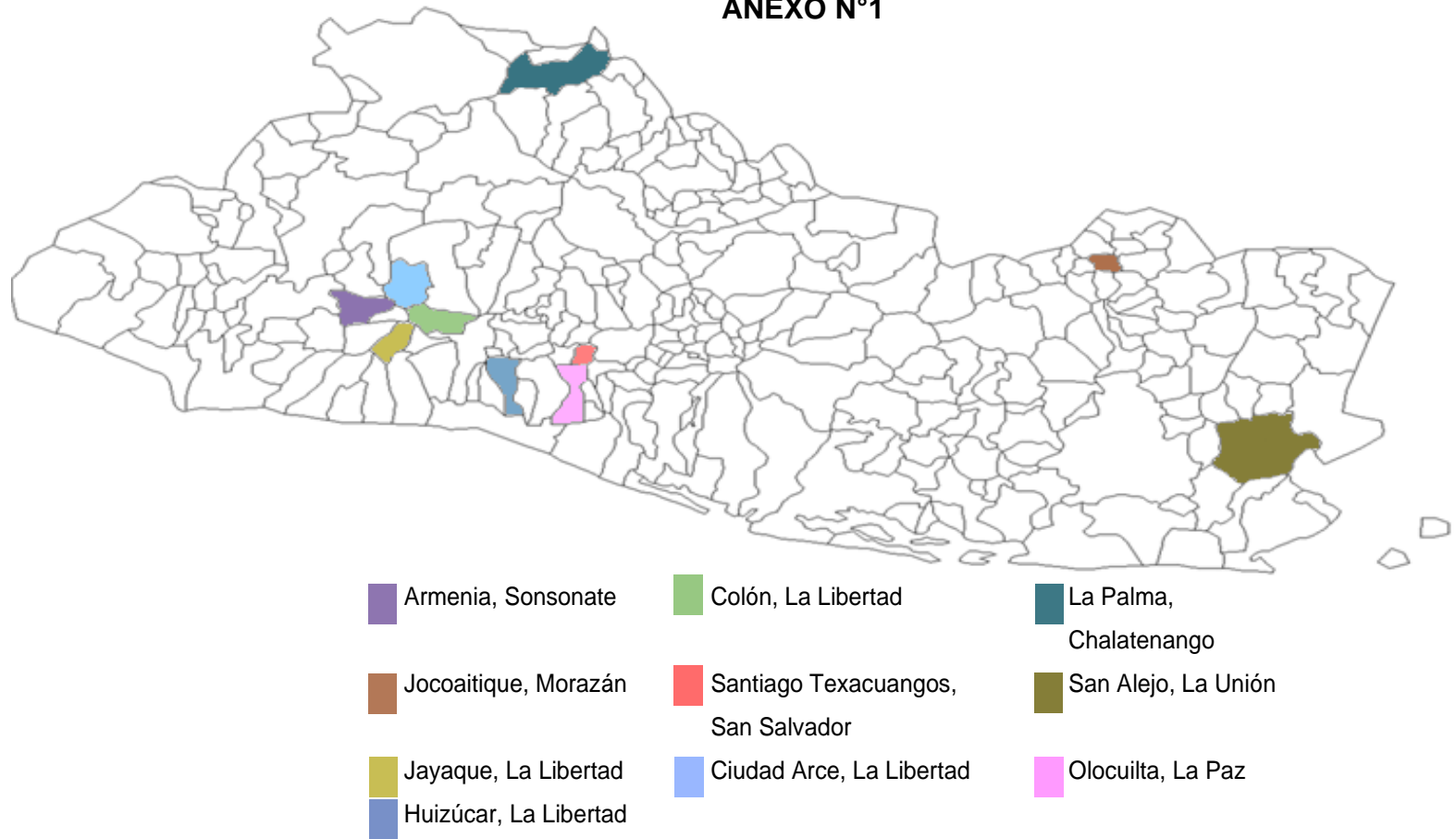


Figura N° 14. Distribución de lugares de los propoleos proporcionados por apicultores colaboradores.

ANEXO N° 2

Cuadro N° 13. Hoja de identificación de muestras de propóleos y características organolépticas.

Hoja de identificación de muestras de propóleos.		
Código de muestra:		
Lugar de procedencia:		
Características Sensoriales (Organolépticas)	Color	Amarillo, café, verde, gris y otros
	Aspecto:	Masa redonda con brillo
		Masa irregular con poco brillo
		Trozos irregulares opacos
		Trozos irregulares con brillo
		Polvo o granulado
	Olor	Inodoro
		Resinoso
		Resinoso suave
		Resinoso aromático
		Resinoso muy aromático
	Consistencia	Muy blanda
		Blanda
		Poco blanda
		Dura
	Sabor	Picante
Dulce		
Amargo		
Insípido		
Descripción final		
Observaciones		

ANEXO N° 3

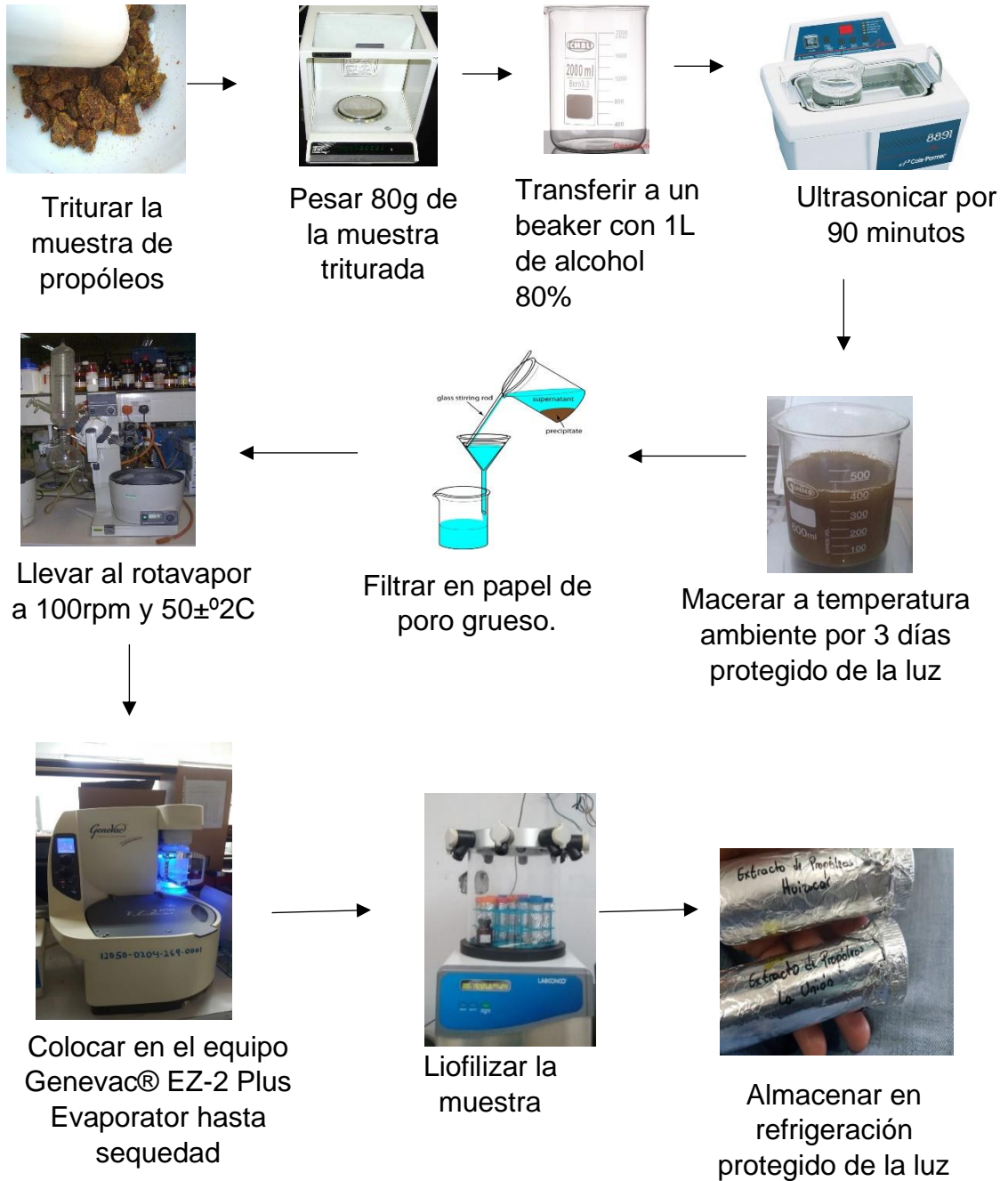


Figura N° 15. Esquema de trabajo de preparación de extractos de propóleos.

ANEXO N° 4



Figura N° 16. Esquema de trabajo de identificación de metabolitos secundarios por Cromatografía en Capa Fina.

ANEXO N° 5

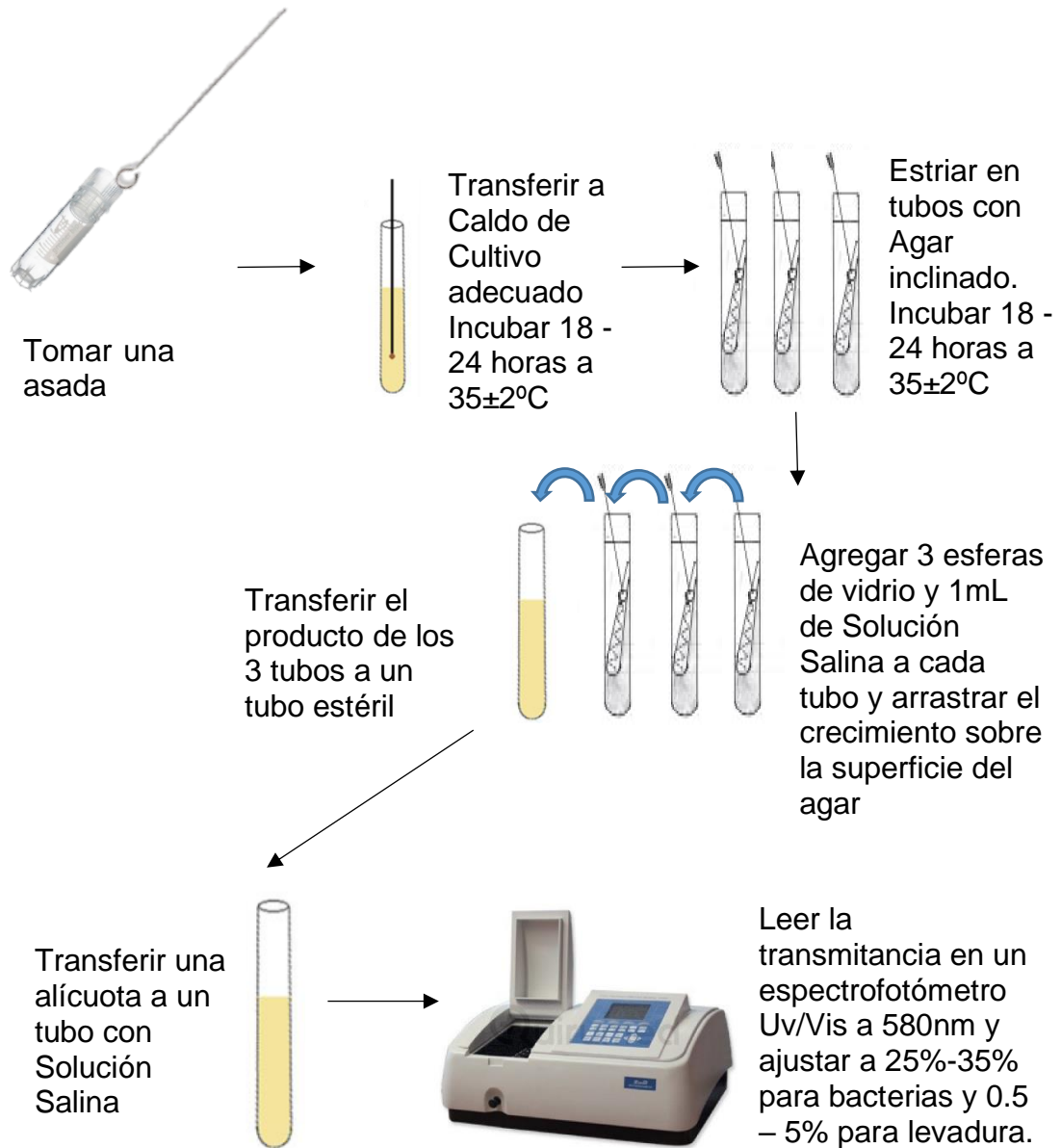


Figura N° 17. Esquema de trabajo para el cultivo de trabajo microbiológico.

ANEXO N° 6

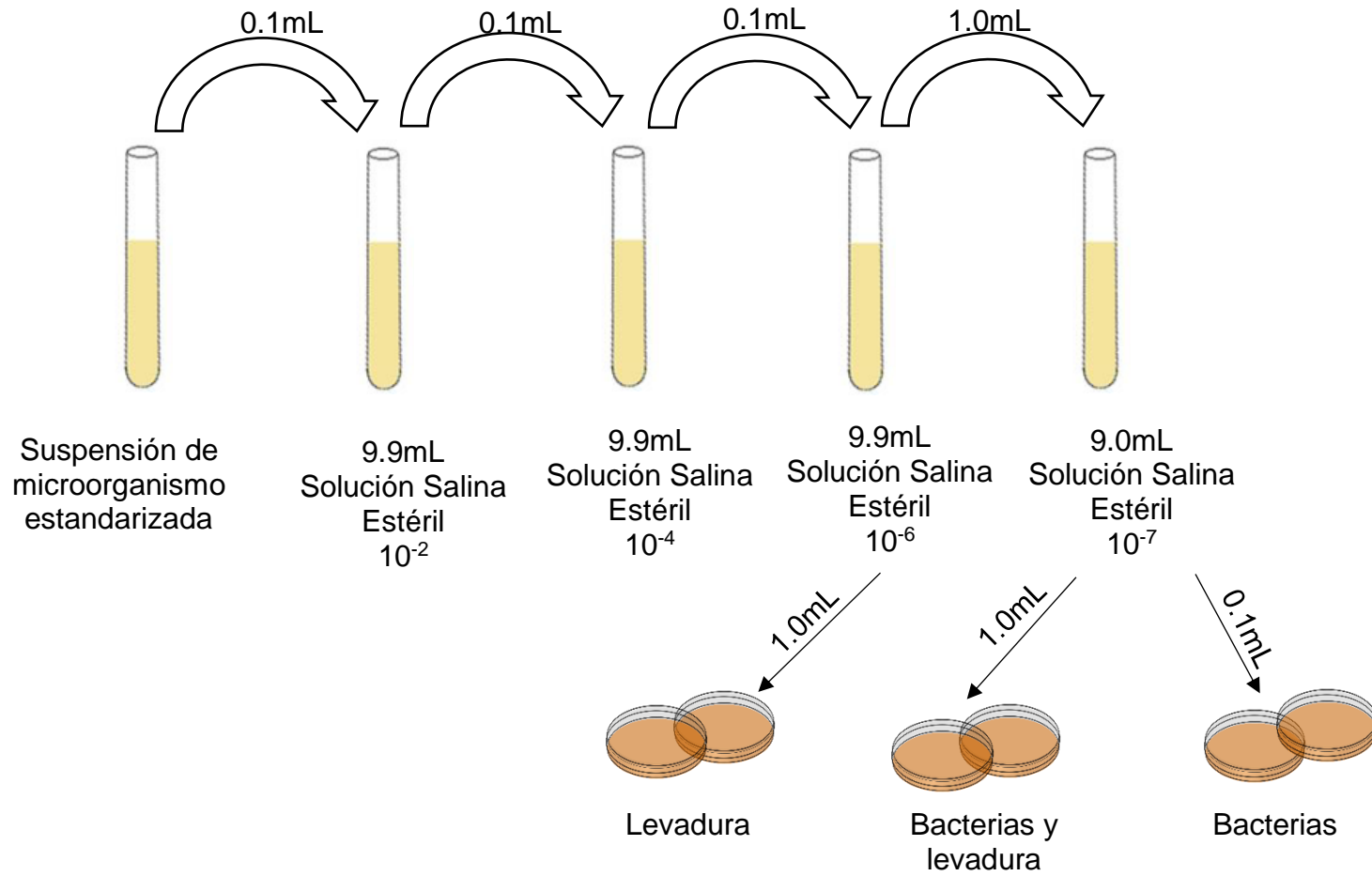


Figura N° 18. Esquema de verificación de recuento de microorganismo.

ANEXO N° 7

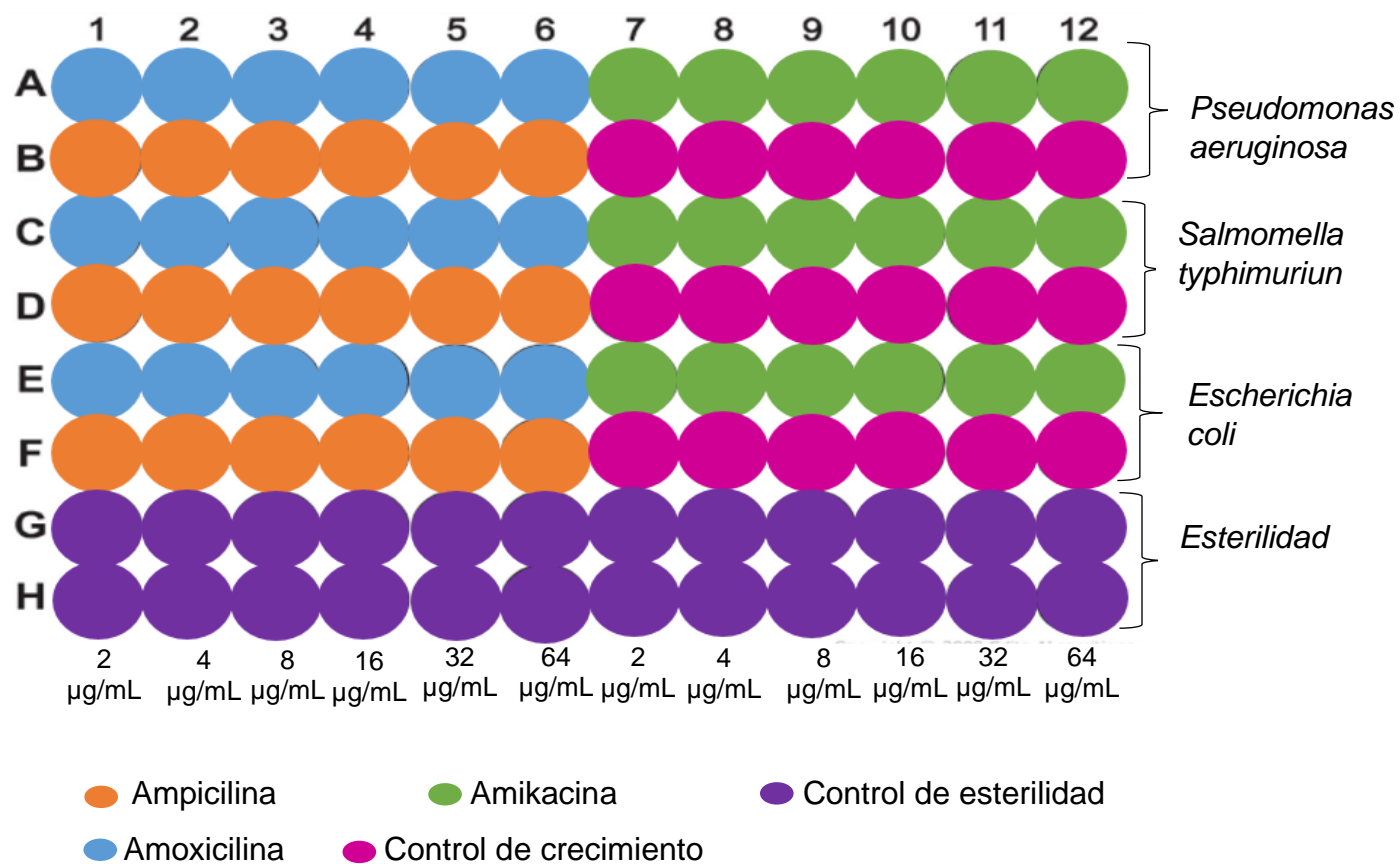


Figura N° 19. Distribución de pocillos para selección de antibiótico y determinación de su concentración mínima inhibitoria (CMI) placa A.

ANEXO N° 8

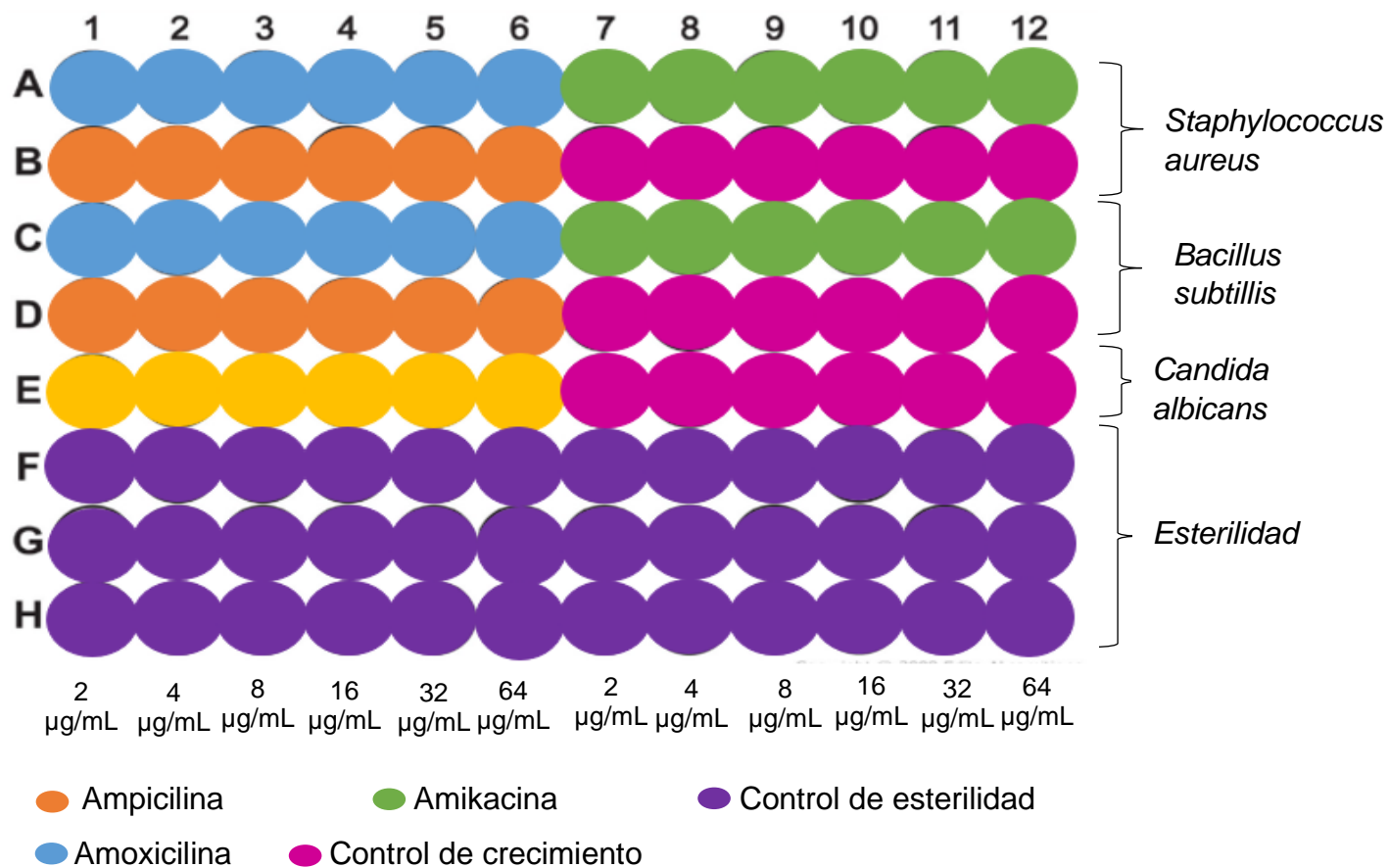


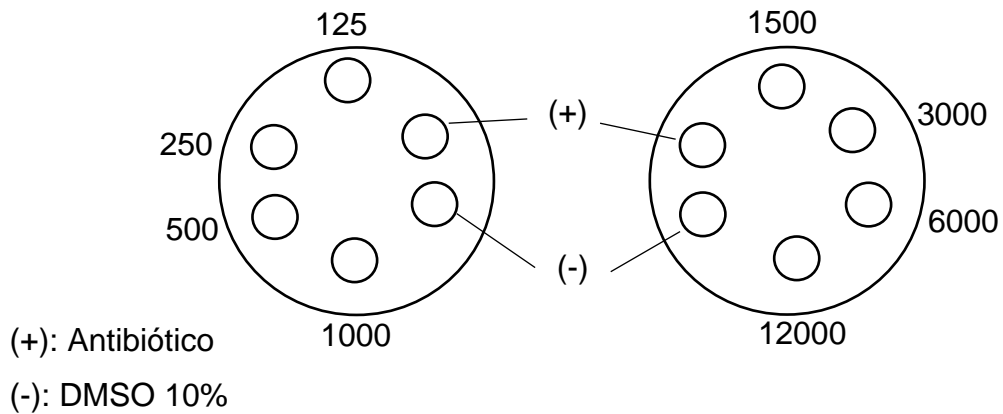
Figura N° 20. Distribución de pocillos para selección de antibiótico y determinación de su concentración mínima inhibitoria (CMI) placa B.

ANEXO N° 9

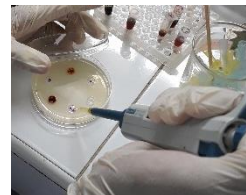
Preparar las siguientes diluciones del extracto a evaluar.



Preparar placas con 20mL de Agar Mueller Hinton o Sabouraud Dextrosa y realizar pocillos de 4mm.



Realizar hisopado de la placa con el microorganismo de interés



Agregar 100 μL de cada dilución de extracto en el pocillo correspondiente y de control positivo y negativo

Figura N° 21. Esquema de trabajo para ensayo de difusión en agar.

ANEXO N° 10

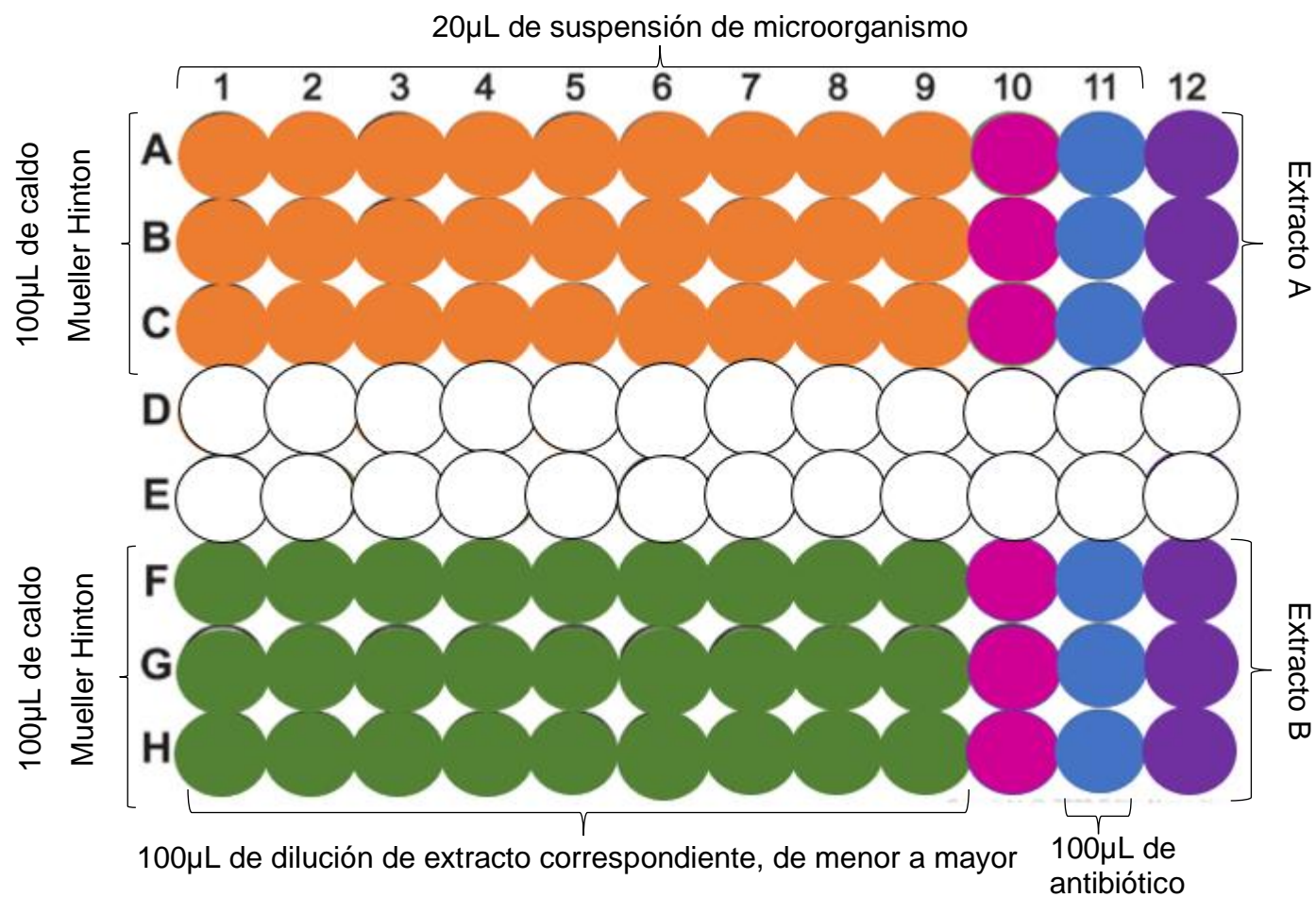


Figura N° 22. Distribución de pocillos para determinación de CMI de extractos de propóleos.

ANEXO N° 11

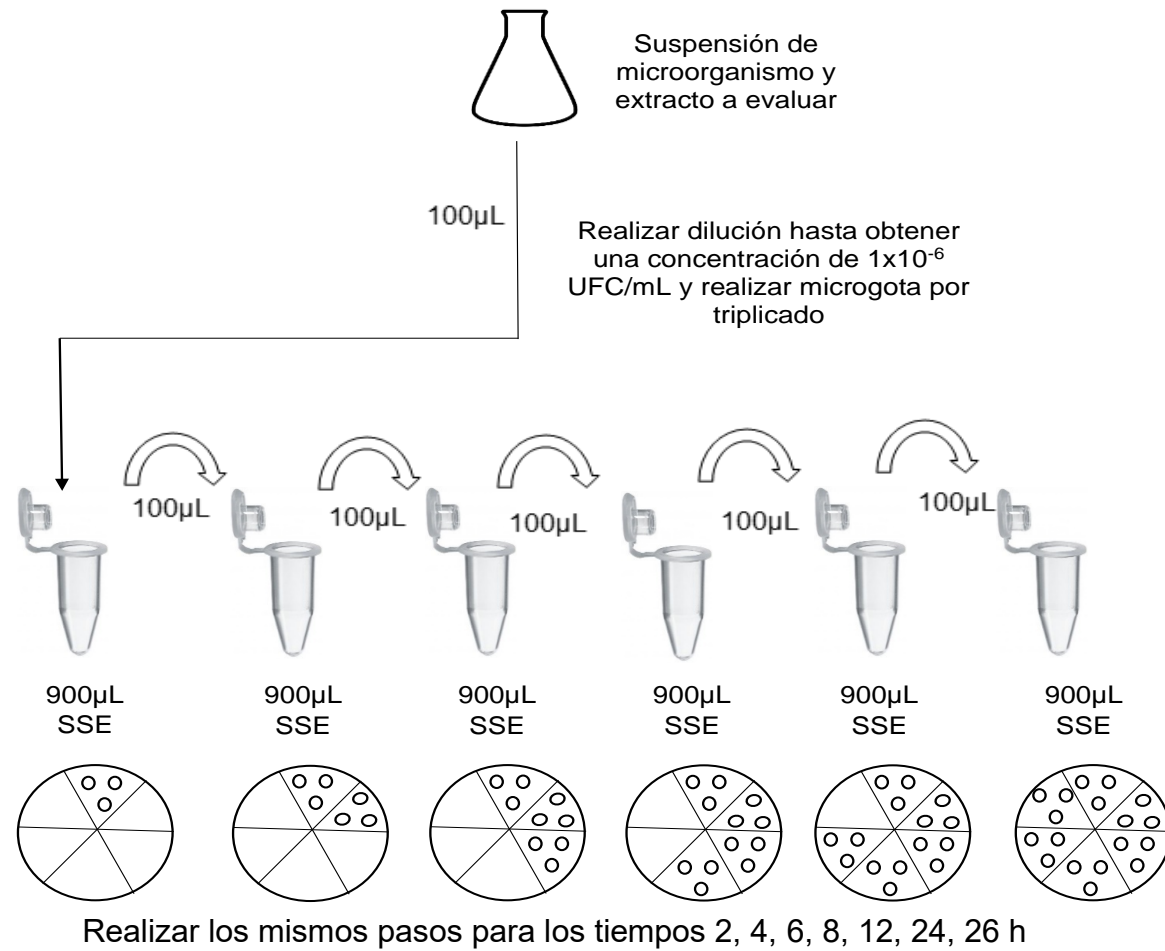


Figura N°23. Esquema general de trabajo para ensayo de curva de muerte.

ANEXO N° 12

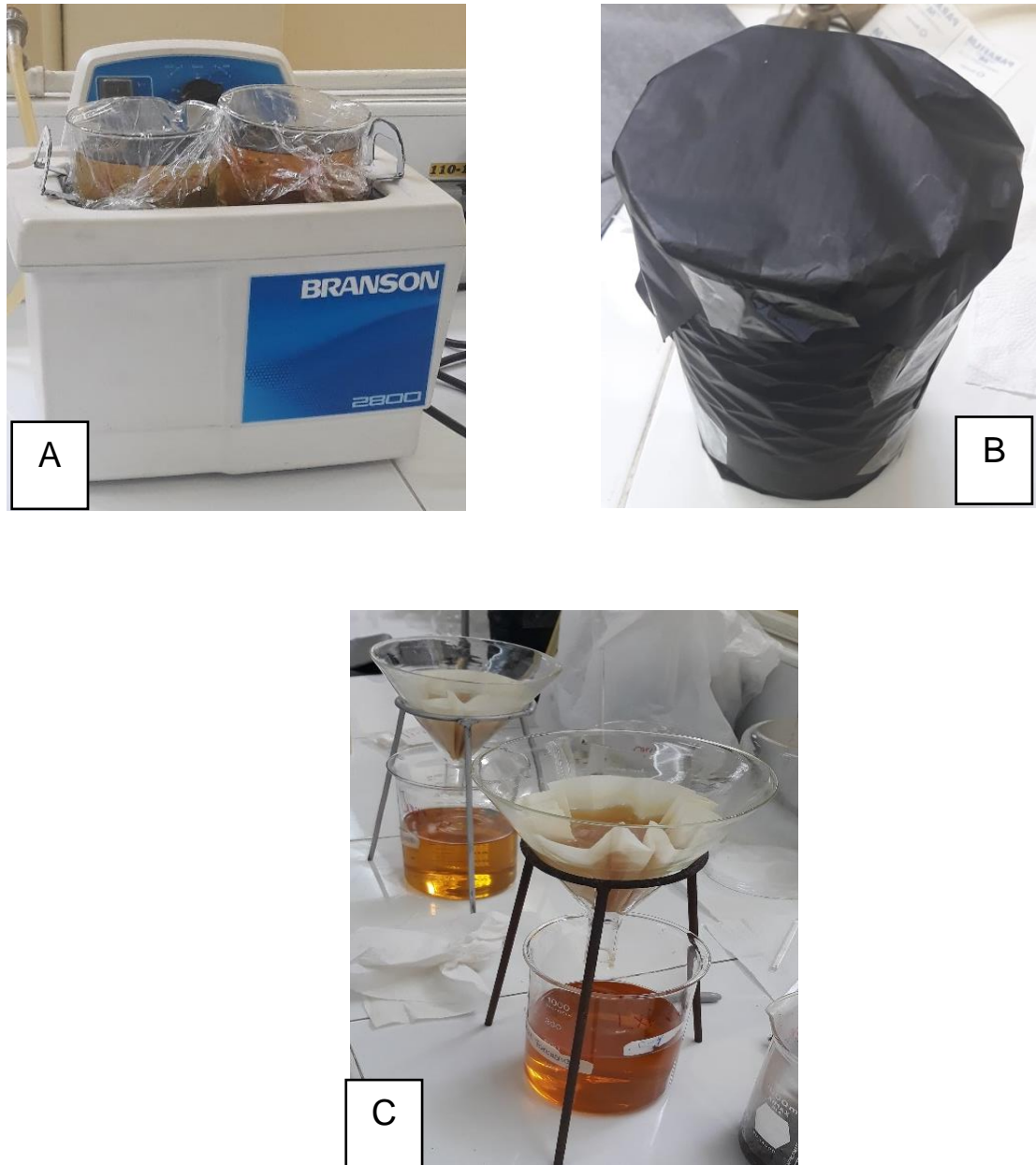


Figura N° 24. (A) Extractos de propóleos en ultrasonicador. (B) Maceración de extractos de propóleos protegidos de la luz. (C) Filtración de extractos de propóleos.

ANEXO N° 13



Figura N° 25. (A) Equipo rotavapor. (B) Extracto obtenido al finalizar proceso de rotaevaporación, (C) Equipo Genevac® Ez-2 Evaporator. (D) Equipo liofilizador.

ANEXO N° 14

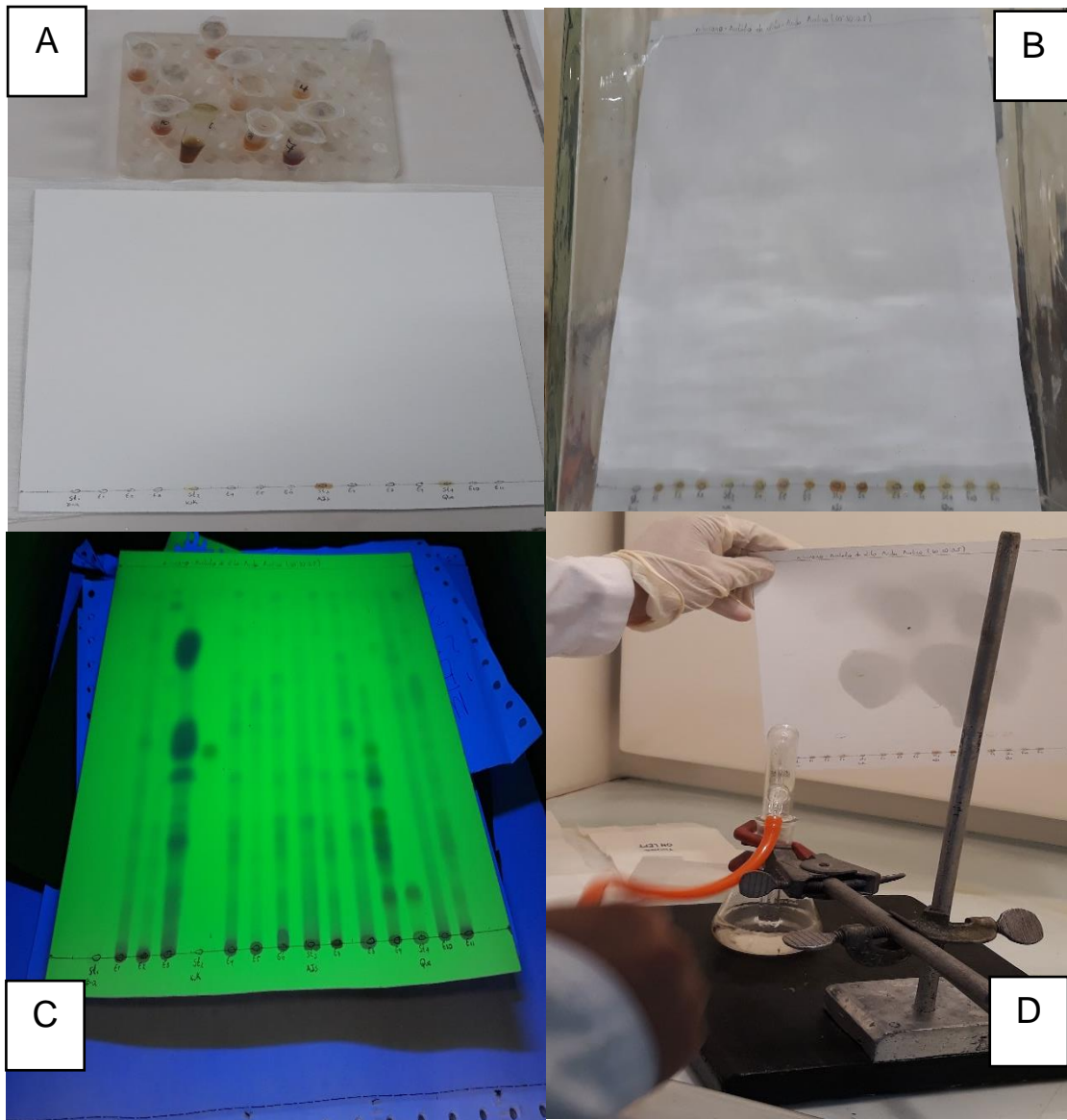


Figura N°26. (A) Proceso de aplicación de extractos y estándares en cromatopla. (B) Proceso de elución de fase móvil. (C) Revelado con luz ultravioleta a 254nm. (D) Proceso de revelado químico utilizando óleum para posteriormente calentar en hot plate a 105°C.

ANEXO N° 15

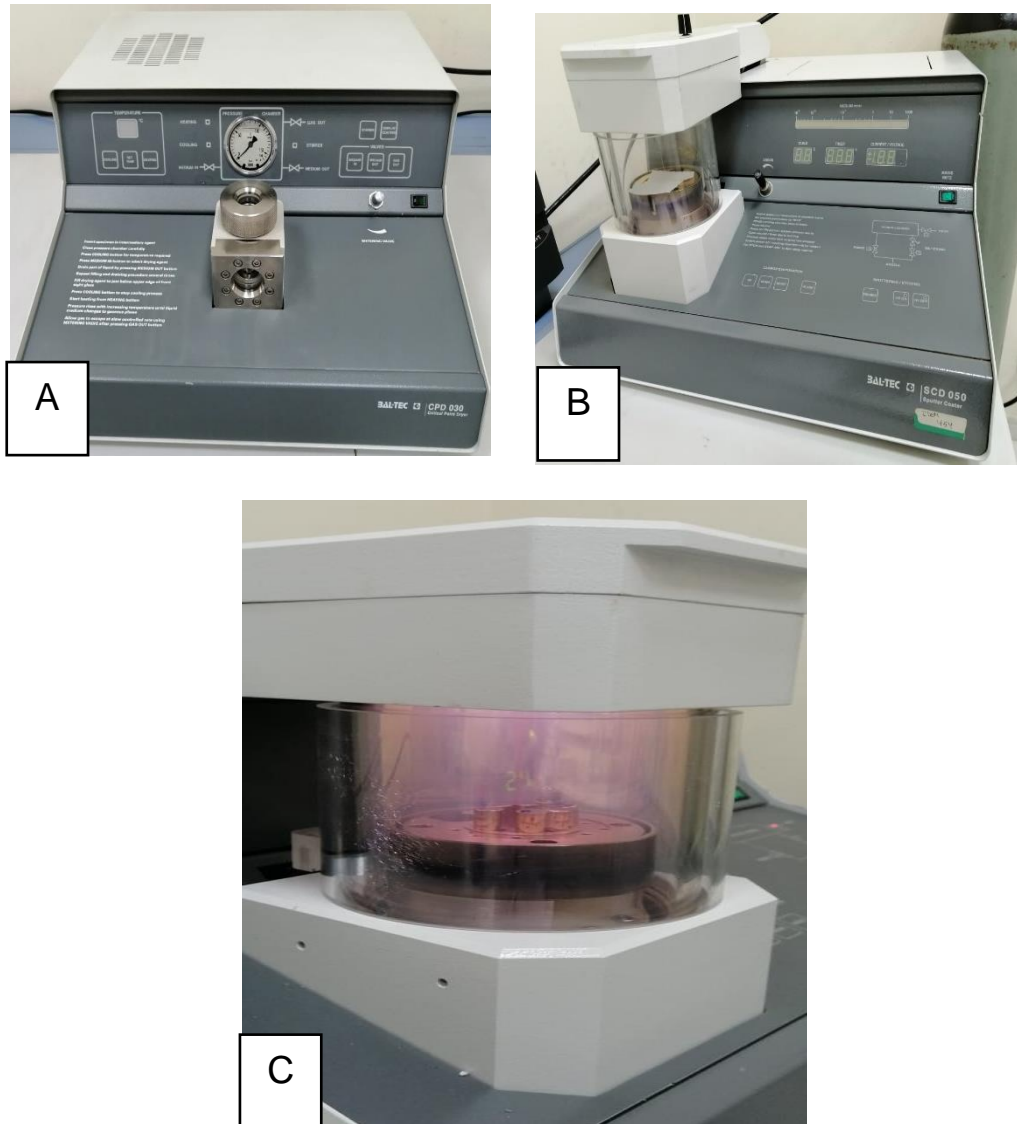


Figura 27. (A) Equipo BAL-TEC CPD 030 Critical Point Dryer (B) Equipo BALTEC SCD 050 Sputter Coater. (C) Equipo BAL-TEC SCD 050 Sputter coater durante el proceso de recubrimiento con oro de las muestras.

ANEXO N° 16

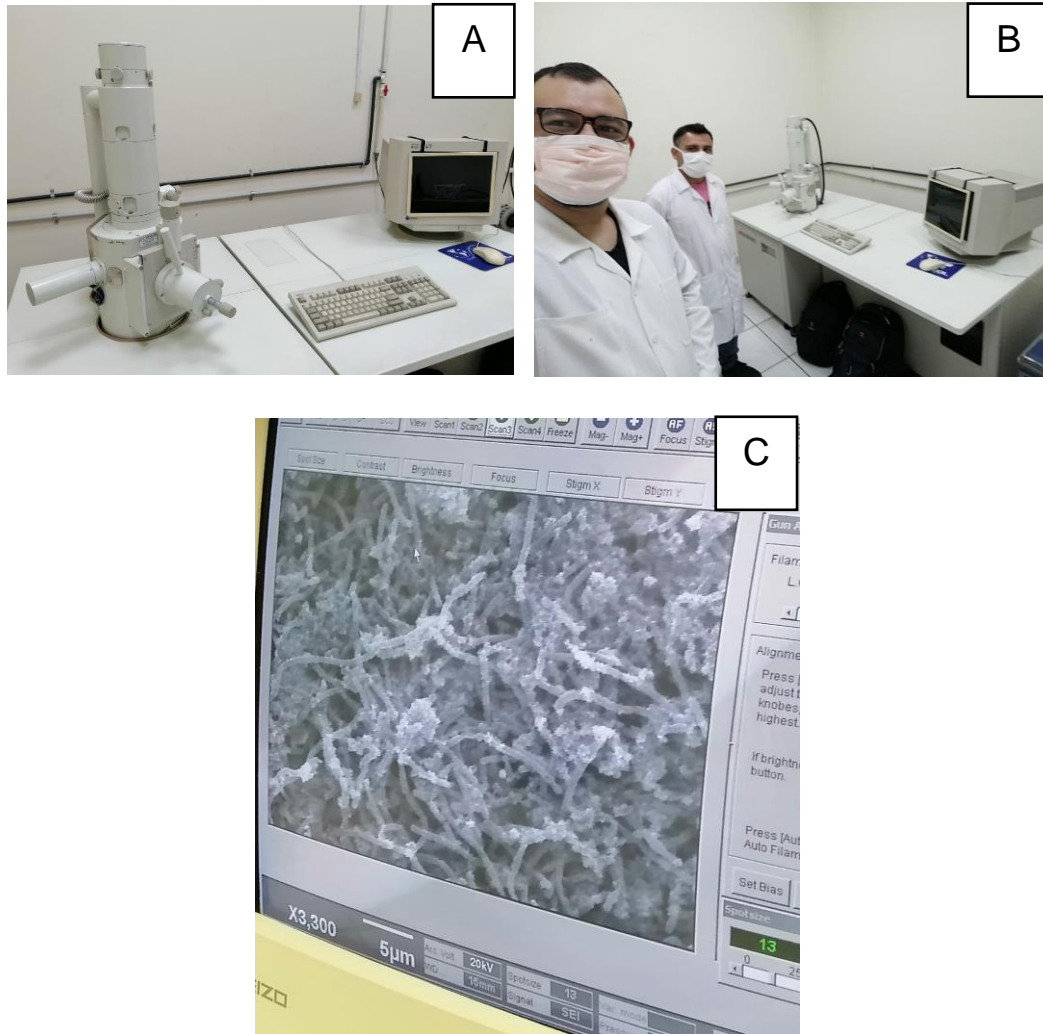


Figura N° 28. (A) Microscopio Electrónico de Barrido. (B) Estudiantes investigadores durante el proceso de uso del microscopio electrónico de barrido. (C) Previsualización de una de las muestras.

ANEXO N° 17

MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS

MATERIALES Y CRISTALERÍA

- Aro metálico.
- Asas metálicas.
- Balón volumétrico de 500 mL de fondo redondo.
- Base metálica.
- Cámara cromatográfica.
- Canastas Microporus Specimen Capsules 30 microns de medidas 12mmDO x 11 mmH
- Cromato placas de aluminio recubiertas de Silice Gel.
- Embudo de vidrio.
- Esferas de vidrio.
- Hisopos con base de madera.
- Papel filtro de poro grueso.
- Pie de rey.
- Pipeteadores.
- Placas de 96 pocillos estériles.
- Placas Petri estériles.
- Puntas para pipeteador.
- Reloj de vidrio.
- Taladratapones (orador).
- Tubos capilares.
- Tubos de ensayo.
- Tubos Eppendorf.
- Tubos Falcon de 100 mL.
- Vaso de precipitado de 1000 mL.

EQUIPOS

- Autoclave.
- Campana de extracción de gases.

- Centrifugadora.
- Cuenta colonias.
- Equipo de recubrimiento con oro (BAL-TEC SCD 050 Sputter Coater)
- Equipo de secado punto crítico (BAL-TEC CPD 030 Critical Point Dryer)
- Equipo evaporador (Genevac® EZ-2 Plus Evaporator)
- Equipo Rotavapor.
- Espectrofotómetro UV/Visible.
- Hot plate.
- Incubadoras.
- Lámpara UV de 254 nm.
- Liofilizador.
- Microscopio compuesto.
- Microscopio electrónico de barrido.
- Refrigeradora.
- Ultracongelador.
- Ultrasonicador.

REACTIVOS.

- Acetato de etilo.
- Acetona.
- Ácido acético glacial.
- Buffer fosfato.
- Cloruro de sodio cristales.
- Dimetilsulfoxido.
- Etanol 90 %
- Etanol absoluto.
- Glutaraldehído al 2.5%.
- N-hexano.
- Osmio.
- Placas de oro para equipo BAL-TEC SCD 050 Sputter Coater.

- Reactivo Oleum.

INDICADOR BIOLÓGICO.

- Resazurina.

ANTIBIÓTICOS Y ANTIMICÓTICO.

- Amikacina.
- Amoxicilina.
- Ampicilina.
- Clotrimazol.

CEPAS DE REFERENCIA.

- *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* ATCC6633.
- *Candida albicans* ATCC10231.
- *Escherichia coli* ATCC25922.
- *Pseudomona aeruginosa* ATCC9027.
- *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* ATCC14028.
- *Staphylococcus aureus* ATCC25923.

MEDIOS DE CULTIVO.

- Agar Mueller Hinton.
- Agar Nutritivo.
- Agar Sabouraud Dextrosa.
- Caldo Mueller Hinton.
- Caldo nutritivo.
- Caldo Sabouraud dextrosa.