



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN**

**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA
DEL EXTRACTO DE PROPÓLEO EN BACTERIAS DE
IMPORTANCIA CLÍNICA”**

T É S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTAN:
ELENA BERENICE NAVA SOBERANES
ULISES EDUARDO PÉREZ AGUILAR**

ASESORES:

**M.V.Z. GERARDO CRÚZ JIMÉNEZ
M.V.Z. JOSÉ ANTONIO LICEA VEGA
M. En C. SOFÍA GONZÁLEZ GALLARDO**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

VOTOS APROBATORIOS

DEDICATORIAS

A MI MADRE Y PADRE

Porque gracias a ustedes, existo en este mundo, soy lo que soy, y he logrado lo que he logrado. Sobre todo gracias MAMI por todo tu amor y por ser la gran mujer que eres.

A MIS HERMANOS

Por la gran dicha y fortuna que Dios me ha brindado al poseer dos hermanos:
LIZBEHT ROXANA NAVA SOBERANES Y GERARDO DANIEL NAVA
SOBERANES a los cuales amo con todo mi corazón, y agradezco su amor
incondicional.

A MI ESPOSO

Gracias JOSÉ ANTONIO RANGEL CERVANTES, por todo el amor, la paciencia,
el apoyo, e inspiración que me has brindado.

A MIS AMIGOS

MARISOL SOLORIO RODRÍGUEZ, NELLY HERNÁNDEZ, ALEJANDRA
RAMÍREZ HERNÁNDEZ, ALEXSANDRA, LULU, ALEJANDRA JAZMIN,
ALEJANDRO MENDOZA, por ser uno de los más grandes tesoros y más hermosos
que he encontrado a lo largo de la vida, gracias por su amistad y todo su cariño en los
momentos más difíciles de mi vida.

A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Al profesor GERARDO CRUZ JIMÉNEZ, SOFÍA GONZALEZ GALLARDO Y
JOSÉ ANTONIO LICEA VEGA, por todo su tiempo, dedicación y paciencia. A
todas las personas que me apoyaron para la elaboración de esta tesis

DEDICATORIAS

A mi Madre

Por enseñarme a ser una buena persona y a dar lo que se tiene sin esperar nada. Sin ti no sería lo que soy: GRACIAS MAMA

A mi Padre

Por ser la parte que siempre me dio fuerza y el mejor consejo que siempre he tenido. El hombre más extraordinario que he conocido en mi vida.

A mi Esposa

Contigo en mi vida sé que nada me falta, eres mi equilibrio y la razón de querer ser más siempre. Te Amo Flaca!

A mi hermana

Por siempre estar cuando más te necesito y cuidarme, a ti no tengo ni como pagarte hermanita. Y por regalarnos a ese niño precioso, mi tocayo.

A mis amigos

Por compartir los momentos que me he sentido más tranquilo y feliz. Y sobre todo a Memo, Isma, Marco, Adán, Lalo(Centri), Rubén, Arita, y los Mamuts que me falten por haberme controlado o aguantado y estado conmigo. Gracias.

A Bere

Por estar en las buenas y las malas y haber sacado esto adelante. Gracias Bere.

Al Profesor Gerardo, Dr. Antonio y Profesora Sofía

Por darnos ese tiempo y paciencia para que este trabajo saliera adelante y también por los consejos que son lo más valioso que alguien puede atesorar.

A mi casa (la **UNAM**) le deberé por siempre la vida y las personas que hasta estos días me acompañan, LO MEJOR DE MI VIDA!

ÍNDICE GENERAL.....	I
ÍNDICE DE FIGURAS.....	II
ÍNDICE DE GRÁFICAS.....	III
ÍNDICE DE TABLAS.....	IV
ABREVIATURAS.....	V
RESUMEN.....	1

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1 Importancia del desarrollo de la resistencia a antibióticos (RA).....	2
1.2 La alternativa de los productos naturales.....	3
1.3 Infecciones intrahospitalarias (IH).....	4
1.4 Agentes etiológicos de las infecciones intrahospitalarias (IH).....	6
1.5 Enfermedades infecciosas en países subdesarrollados.....	10
1.6 Infecciones respiratorias.....	11
1.7 Enfermedades emergentes y resurgentes.....	11
1.8 El Propóleo.....	14
1.8.1 Antecedentes del Propóleo.....	15
1.8.2 Composición química.....	16
1.8.3 Propiedades físicas.....	17
1.8.4 Actividad biológica del Propóleo.....	18
1.8.5 Producción del Propóleo.....	19
1.8.5.1 Efecto de la raza de abejas en la producción de Propóleo.....	20
1.8.5.2 Técnicas de recolección.....	20
1.8.5.2.1 Raspado.....	21
1.8.5.2.2 Rejillas.....	22
1.8.5.2.3 Mallas plásticas.....	23
1.8.5.2.4 Colmena Propolizadora Inteligente (CPI).....	23
1.8.5.2.4.1. Colmena Pirassununga.....	24
1.8.6 Almacenamiento del Propóleo.....	25
1.8.7 Uso del Propóleo dentro de la colmena.....	25
1.8.8 Uso comercial del Propóleo.....	27

1.8.9	<i>Valor económico del Propóleo</i>	28
2.	JUSTIFICACIÓN	31
3.	HIPÓTESIS	31
4.	OBJETIVOS	31
4.1	Objetivo general	31
4.2	Objetivos particulares	32
5.	MATERIALES Y MÉTODOS	32
5.1	Métodología	32
5.1.1	<i>Elaboración del extracto de Propóleo</i>	33
5.1.2	<i>Ensayo en microplaca (preparación)</i>	33
5.1.3.1	<i>Ensayo en microplaca</i>	34
5.1.3.2	<i>Lectura e interpretación de resultados</i>	35
5.1.3.3	<i>Determinación de la CMB</i>	37
5.1.3.4	<i>Determinación de la CMI</i>	37
5.1.3.5	<i>Determinación del efecto bactericida y/o bacteriostático</i>	37
5.2.3	<i>Microscopía Electrónica de Transmisión</i>	38
5.2.3.1	<i>Preparación de las rejillas con Fomvar</i>	39
5.2.3.2	<i>Técnica de Tinción Negativa</i>	39
6.	RESULTADOS	41
6.1	Evaluación del efecto inhibitorio del extracto de Propóleo	41
6.1.1	<i>Comportamiento de las cepas bacterianas y Candida albicans (levadura) frente al extracto de Propóleo</i>	42
6.1.2	<i>Susceptibilidad, de las cepas bacterianas y Candida albicans (levadura) a las diferentes concentraciones del extracto</i>	43
6.1.3	<i>Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de cada una de las cepas bacterianas y Candida albicans (levadura)</i>	44
6.2	Efecto bactericida y/o bacteriostático	54
6.2.1	<i>Determinación de la CMB y/o CMI, en las cepas bacterianas y Candida albicans (levadura)</i>	54
6.3	Observaciones obtenidas en el Microscopio Electrónico de Transmisión	55
6.3.1	<i>Streptococcus del Grupo D, tratado con el extracto de Propóleo</i>	55
6.3.2	<i>Salmonella typhi, tratada con el extracto de Propóleo</i>	56
6.3.3	<i>Klebsiella pneumoniae, tratada con el extracto de Propóleo</i>	57

7. DISCUSIÓN.....	58
8. CONCLUSIONES.....	66
9. SUGERENCIAS.....	67
10. APÉNDICE.....	68
10.1 Aislamiento de bacterias.....	68
10.2 Métodos de identificación bacteriana.....	69
10.3 Absorbancias y resultados cualitativos obtenidos del ensayo en microplaca en bacterias Gram (+), candida albicans (levadura) y Gram (-) tratadas con el extracto de propóleo.....	77
10.4 Material, equipo y reactivos.....	81
10.4.1 Material.....	81
10.4.2 Material biológico.....	82
10.4.3 Equipo.....	83
10.4.4 Reactivos.....	84
<i>10.4.4.1 Preparación de reactivos.....</i>	<i>85</i>
11. REFERENCIAS.....	86

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1.- Abeja <i>Apis mellifera</i>	16
Figura 2.- Estructuras de algunos de los compuestos, identificados en el extracto de Propóleo, a los que se les atribuye actividad farmacológica.....	17
Figura 3.- Uso de rejillas para la recolección de Propóleo en la colmena.....	22
Figura 4.- (A) El estuche adaptado, sobre cámara de cría y alza melaria, con su abertura inicial; (B) Cortina de propóleo formada; (C) Cortina de propóleo formada.....	25
Figura 5.- Utilidad del Propóleo en la colmena.....	26
Figura 6.- Algunos de los usos comerciales del Propóleo.....	28
Figura 7.- Diagrama General de Trabajo.....	32
Figura 8.- Microplaca con diluciones de extracto de Propóleo a evaluar, evidenciando actividad bacteriana con el reactivo de MTT.....	36
Figura 9.- Determinación del efecto bactericida/bacteriostático en la bacteria <i>Pseudomonas fluorescens</i>	38
Figura 10.- Técnica de Tinción Negativa.....	40
Figura 11.- Microfotografías de <i>Streptococcus</i> del Grupo D: control (+) y tratados con el extracto de Propóleo, obtenidas del Microscopio Electrónico de Transmisión.....	55
Figura 12.- Microfotografías de <i>Salmonella typhi</i> : control (+) y tratados con el extracto de Propóleo, obtenidas del Microscopio Electrónico de Transmisión.....	56
Figura 13.- Microfotografías de <i>Klebsiella pneumoniae</i> : control (+) y tratados con el extracto de Propóleo, obtenidas del Microscopio Electrónico de Transmisión.....	57

ÍNDICE DE GRÁFICAS

	Pág.
Gráfica 1.- Comparativo de las 20 cepas aisladas y ensayadas con extracto de Propóleo.....	41
Gráfica 2.- Determinación de la CMI del extracto de Propóleo en <i>Candida albicans</i> (levadura).....	44
Gráfica 3.- Determinación de la CMI del extracto de Propóleo en <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	44
Gráfica 4.- Determinación de la CMI del extracto de Propóleo en <i>Streptococcus</i> del Grupo D.....	45
Gráfica 5.- Determinación de la CMI del extracto de Propóleo en <i>Staphylococcus aureus</i>	45
Gráfica 6.- Determinación de la CMI del extracto de Propóleo en <i>Staphylococcus B-lisina</i>	46
Gráfica 7.- Determinación de la CMI del extracto de Propóleo en <i>Staphylococcus epidermidis</i>	46
Gráfica 8.- Determinación de la CMI del extracto de Propóleo en <i>Staphylococcus saprophyticus</i>	47
Gráfica 9.- Determinación de la CMI del extracto de Propóleo en <i>Streptococcus agalactiae</i>	47
Gráfica10.- Determinación de la CMI del extracto de Propóleo en <i>Streptococcus pyogenes</i>	48
Gráfica11.- Determinación de la CMI del extracto de Propóleo en <i>Enterobacter aerogenes</i> .	48
Gráfica12.- Determinación de la CMI del extracto de Propóleo en <i>Enterobacter cloacae</i>	49
Gráfica13.- Determinación de la CMI del extracto de Propóleo en <i>Escherichia coli</i> .	49
Gráfica14.- Determinación de la CMI del extracto de Propóleo en <i>Klebsiella pneumoniae</i>	50
Gráfica15.- Determinación de la CMI del extracto de Propóleo en <i>Listeria monocytogenes</i>	50
Gráfica16.- Determinación de la CMI del extracto de Propóleo en <i>Pasteurella multocida</i>	51

Gráfica17.- Determinación de la CMI del extracto de Propóleo en <i>Proteus mirabilis</i>	51
Gráfica18.- Determinación de la CMI del extracto de Propóleo en <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	52
Gráfica19.- Determinación de la CMI del extracto de Propóleo en <i>Pseudomonas fluorescens</i>	52
Gráfica20.- Determinación de la CMI del extracto de Propóleo en <i>Salmonella typhi</i>	53
Gráfica21.- Determinación de la CMI del extracto de Propóleo a diferentes concentraciones en <i>Vibrio cholerae</i>	53

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1.- Distribución de las infecciones nosocomiales.....	10
Tabla 2.- Oferta y demanda de los productos de la colmena en el país.....	29
Tabla 3.- Preparación del Ensayo en Microplaca.....	35
Tabla 4.- Comportamiento encontrado, en las cepas, frente al extracto de Propóleo a diferentes concentraciones. S (sensible), R (resistente).....	42
Tabla 5.- Diferencias encontradas en la susceptibilidad, de las cepas bacterianas y <i>Candida albicans</i> (levadura), a las diferentes concentraciones del extracto de Propóleo.....	43
Tabla 6.- Resultados de la Concentración Mínima Bactericida (CMB) y/o de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto de Propóleo.....	56
Tabla 7.- Cepas utilizadas en el presente estudio.....	68
Tabla 8.- Pruebas de identificación realizadas a la levadura <i>Candida albicans</i>	69
Tabla 9.- Pruebas de identificación realizadas al Género microbiano <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	70
Tabla 10.- Pruebas de identificación realizadas a las Enterobacterias.....	71
Tabla 11.- Pruebas de identificación realizadas a la bacteria <i>Listeria monocytogenes</i>	72
Tabla 12.- Pruebas de identificación realizadas a la bacteria <i>Pasteurella multocida</i>	73
Tabla 13.- Pruebas de identificación realizadas a la bacteria <i>Pseudomonas spp.</i>	74
Tabla 14.- Pruebas de identificación realizadas a la bacteria <i>Staphylococcus spp.</i>	75
Tabla 15.- Pruebas de identificación realizadas a la bacteria <i>Streptococcus spp.</i>	76
Tabla 16.- Valores de absorbancia del ensayo en microplaca de las bacterias Gram (+) y <i>Candida albicans</i> , tratadas con el extracto de	77

	Propóleo.....	
Tabla 17.-	Resultados cualitativos obtenidos en microplaca de las bacterias Gram (+) y de <i>Candida albicans</i> , tratadas con el extracto de Propóleo.....	78
Tabla 18.-	Valores de absorbancia del ensayo en microplaca de las bacterias Gram (-), tratadas con el extracto de Propóleo.....	79
Tabla 19.-	Resultados cualitativos obtenidos en microplaca de las bacterias Gram (-), tratadas con el extracto de Propóleo.....	80

ABREVIATURAS	SIGNIFICADO
Abs	(Absorbancia)
AFT	(Ácido Fosfotúngstico)E
AS	(Agar sangre)
°C	(Grados centígrados)
CMI	(Concentración Mínima Inhibitoria)
CBM	(Concentración Mínima Bactericida)
DMSO	(Dimetil sulfóxido)
G	(gramos)
Hrs	(horas)
IH	(Infecciones Hospitalarias ó nosocomiales)
IL-1	(Interleucina-1)
IL-2	(Interleucina-2)
L	(Litro)
Lb	(libras)
MET	(Microscopia Electrónica de Transmisión)
µg/µl	(microgramos por microlitro)
mg/ml	(miligramos por mililitro)
ml	(mililitro)
Mm	(milímetros)
MH	(Miuller Hinton)
MTT	Bromuro (3-[4,5-dimetiltiazol-2-ilo]-2,5-difeniltetrazol)
Nm	(nanómetros)
RA	(Resistencia a Antibióticos)
RM	(Rojo de Metilo)
Rpm	(revoluciones por minuto)
SSF	(Solución Salina Fisiológica)
ST	(Solución de Trabajo)
UCI	(Unidad de Cuidados Intensivos)

Resumen

El objetivo del presente trabajo es determinar el efecto inhibitorio y/o bactericida del extracto de Propóleo en bacterias de importancia clínica mediante el Ensayo de MTT modificado y Microscopia Electrónica de Transmisión. Las bacterias ensayadas son: *Candida albicans* (levadura), *Corynebacterium pseudotuberculosis*, *Enterococcus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus B-Lisina*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Pasteurella multocida*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella typhi* y *Vibrio cholerae*. Ello porque en la actualidad existe gran problemática acerca de la resistencia desarrollada por las bacterias, a una gran cantidad de antibióticos, aunado a este problema existen muchos factores que promueven la emergencia y resurgencia de muchas enfermedades (aparentemente controladas), que nos obligan a buscar diversas alternativas para su tratamiento y/o prevención. Los productos naturales representan una fuente de metabolitos secundarios biológicamente activos y altamente atractivos por sus escasos efectos secundarios y actividad comprobada frente a muchas enfermedades, como es el caso del Propóleo. El extracto de Propóleo se preparó colocando 19 g en 2.4 L de etanol al 76%, se esterilizó por filtración en membrana de celulosa de 0.22 μm , se realizó una prueba de esterilidad a dicho extracto colocándolo en un agar MH que se incubó a 37°C de 24-48 hrs, en el cual no existió crecimiento alguno, posteriormente se colocó en un horno a no más de 56°C, para llevar hasta sequedad, se recolectó y colocó en un frasco ámbar en condiciones de esterilidad. Posteriormente se realizó la Solución de Trabajo (con una concentración de 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) la cual fue necesaria para llevar a cabo la Técnica de Microdilución en Caldo así como el Ensayo del MTT modificado lo cual permitió determinar la Concentración Mínima Inhibitoria y/o Concentración Mínima Bactericida. Finalmente se realizó la técnica de tinción negativa y se observó en el microscopio electrónico de transmisión, posibles diferencias estructurales en la bacteria Gram (+) y las Gram (-), seleccionadas de acuerdo a los resultados arrojados. El extracto de Propóleo presenta un efecto inhibitorio en las 20 cepas utilizadas, principalmente en las bacterias Gram (+), como *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* (levadura), que también presentaron un mayor efecto bactericida.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Importancia del desarrollo de la resistencia a antibióticos (RA)

La era de los antibióticos comenzó hace 60 años, con la comercialización de la penicilina. Entonces se tenía la esperanza de que las enfermedades infecciosas desaparecieran. Pero esa pretensión se fue revelando poco a poco imposible. Pronto aparecieron cepas de bacterias que habían desarrollado mecanismos de resistencia a estas nuevas moléculas. Primero lo hicieron en los hospitales de los países desarrollados, pero pronto se transformaron en padecimientos extra hospitalarios y hoy, se encuentran extendidas por todo el mundo, amenazando nuestra capacidad para combatirlos (51).

Los antibióticos se utilizan para tratar infecciones, como la neumonía, causadas por bacterias. Sin embargo, con el transcurso del tiempo, muchos microorganismos se han vuelto resistentes. La resistencia a los antibióticos (RA) es un problema grave para los pacientes individuales y los sistemas de atención sanitaria; en los hospitales, las infecciones causadas por bacterias con (RA) se asocian con tasas más elevadas de mortalidad, morbilidad y estancias hospitalarias prolongadas. A menudo, las bacterias se vuelven resistentes, pues los medicamentos se utilizan con mucha frecuencia y de forma incorrecta. Los estudios han mostrado que aproximadamente, en la mitad de los casos, los médicos en los hospitales no prescriben de forma adecuada. Probablemente sea por las dudas acerca de los riesgos y los beneficios, incluida la decisión de qué opción elegir, en qué dosis y por cuánto tiempo (52).

En este fenómeno están implicados, por un lado, los antibióticos utilizados en medicina y, por otro, y de forma mucho más importante, los utilizados en veterinaria. En E.U., aproximadamente el 50% de los medicamentos antiinfecciosos consumidos se usan en humanos, el 40% en animales, y el 10% restante en agricultura y acuicultura. Además, de ese 40% usado en animales, el 20% se emplea en usos terapéuticos, para tratar enfermedades, mientras que el 80% se emplea en dosis muy bajas como aditivo de los alimentos, para promover su crecimiento. Esto provoca una presión selectiva continua sobre las bacterias que pueblan estas enormes cabañas

animales, que son las reservas medioambientales de un gran número de enfermedades humanas, lo que favorece la aparición de cepas de bacterias multiresistentes (51).

Para hacer frente a esta crisis, los sistemas sanitarios estatales están desarrollando programas de control del uso de antibióticos. En lo que se refiere al uso en humanos, estos programas abogan por una reducción del mal uso de los medicamentos para tratar enfermedades víricas. En los animales, se trata de restringir su uso a profilaxis y terapia, prohibiendo su utilización como promotor del crecimiento (51). La resistencia de los microorganismos puede alcanzar al hombre directamente, a través de tratamientos e indirectamente por el consumo de carne y subproductos (46).

La (RA) dificulta el tratamiento, encarece los costos e incrementa la morbilidad y la mortalidad de los enfermos afectados. A raíz de esta gran problemática se han planteando diversas alternativas, a las que, las cepas bacterianas desarrollen la menor resistencia posible, presenten la menor cantidad de efectos adversos para el paciente, y un efecto farmacológico eficaz, de entre las cuales se encuentran por supuesto los productos naturales.

1.2 La alternativa de los productos naturales

En la actualidad los extractos naturales de plantas es una industria que mueve millones de euros alrededor del mundo. Se conocen aproximadamente 1,340 plantas con potenciales fuentes de componentes antimicrobianos, pero se conocen más de 250,000 especies de plantas que contienen una gran diversidad de componentes bioactivos. Sólo en el año 1999 el negocio global de la venta de suplementos naturales de plantas en humanos excedió los 15 billones de dólares, de los cuales 7 billones fueron en Europa, 2.4 billones en Japón, 2.7 en el resto de Asia y 3 billones en Norte América (46).

Las primeras drogas utilizadas por el hombre eran de origen natural. Hoy en día se utilizan cada vez más preparaciones de productos naturales, para el tratamiento y profilaxis de muchas enfermedades. Estos compuestos muestran un gran alcance debido a sus propiedades farmacológicas, además no crean hábito y sus efectos colaterales son bien tolerados y significativamente débiles en comparación a las preparaciones sintéticas (10).

A menudo los extractos naturales deben su actividad biológica al sinergismo entre sus diversos compuestos ya que éstos por separado pueden limitar su actividad que cuando se encuentran juntos (46). En la actualidad los productos naturales han incrementado su popularidad debido a sus diversos efectos biológicos. Tal es el caso del Propóleo, obtenido a partir de las abejas, el cual, ha sido ampliamente investigado, debido a que se han descubierto innumerables beneficios y aplicaciones. Se sabe que es usado en la industria alimenticia y para prevenir ciertas enfermedades (3).

1.3 Infecciones intrahospitalarias (IH)

Algunas de las especies más significativas clínicamente son *Staphylococcus epidermidis* y *Staphylococcus saprophyticus*, se sabe que son responsables de una variedad de infecciones adquiridas en los hospitales y están asociadas a las infecciones del tracto urinario.

Las infecciones nosocomiales constituyen un problema y un reto para el equipo de salud pública. En México estas infecciones han alcanzado cifras altísimas en los últimos años. El promedio de estas en los hospitales de segundo nivel es de 10 a 15%, lo que significa que ocurren aproximadamente de 600,000 a 750,000 casos de infecciones hospitalarias entre los 6,600,000 que recibieron atención hospitalaria. Otras cifras mencionan que de 3 millones de pacientes hospitalizados por año van a haber un total de 450 mil episodios de infecciones nosocomiales, y si se toma una mortalidad del 5%, es posible que fallezcan 22,500 pacientes por año debido a estas infecciones. Es posible que la mortalidad, considerando la ya mencionada sea del 32.1 por cada 1,000,000 habitantes. Dentro de los principales agentes infecciosos responsables de esta situación se encuentran: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Corynebacterium spp*, *Candida spp* (49). Su importancia se toma en cuenta sólo cuando se tiene consciencia de la carga económica y los costos extra que generan, cuando imprimen su rastro de falta de calidad en los hospitales y dejan una estancia hospitalaria excesiva. Las pérdidas económicas por infecciones nosocomiales son importantes, por el impacto que tiene sobre la estancia del paciente en el hospital y por los costos que suponen las pruebas complementarias. Así se ha estimado que en E.U. el costo de una infección

hospitalaria es de alrededor de 2,100 dólares. En general la mayor parte del incremento de los costos corresponde al alargamiento de la estancia, seguido de la terapia con antibióticos (24).

En E.U. los costos adicionales han sido calculados en 2,200 dólares por caso de infección nosocomial y un promedio de 4 a 14 días de sobreestancia por paciente infectado. Otros estudios muestran que en ese país se producen alrededor de 2 millones de este tipo de infecciones anuales que, en promedio, generan alrededor de cinco días de sobre estadía en el hospital (7.5 días en casos de infección de herida operatoria, 7 a 21 días en casos de bacteriemia, 6.8 a 30 días en casos de neumonía, y 1 a 4 días en casos de infección urinaria). Lo anterior se traduce en 8.7 millones de días cama, utilizados en la atención de las infecciones, a un costo de 4,532 millones de dólares (3). Las cifras encontradas en varios estudios adelantados en América Latina representan entre 10% y 35% del costo total de operación de las unidades de cuidados intensivos. A dicho costo, se debe agregar el costo de oportunidad, es decir, los recursos empleados en mantener las camas de Unidad de Cuidados Intensivos (UCI) con pacientes con infección nosocomial en lugar de emplear esos recursos para otros fines (53).

Las infecciones cruzadas de paciente a paciente o entre el personal del hospital y los pacientes, constituyen un peligro constante. Las infecciones hospitalarias (IH) suelen denominarse infecciones nosocomiales y tienen lugar en aproximadamente 5% de los pacientes admitidos. En ciertos servicios clínicos, como en las unidades de cuidados intensivos, más del 10% de los pacientes adquieren una (IH). En conjunto, en los Estados Unidos, hay cada año 2 millones de afecciones que producen directa o indirectamente 80,000 muertes. Las infecciones hospitalarias se deben en parte a los pacientes enfermos, pero con frecuencia se deben a la presencia de microorganismos patógenos que se han seleccionado y se mantienen en el ambiente del hospital. La mayoría son endémicas más que epidémicas. Estas infecciones las producen organismos que ya están en el ambiente del hospital. Incluso organismos con resistencia múltiple a los fármacos, con frecuencia pasan de hospedador a hospedador como flora normal. Por tanto, prácticamente todos los patógenos nosocomiales importantes forman parte de la microbiota, tanto de pacientes como del personal sanitario (32).

Los hospitales son ambientes especiales. Las enfermedades infecciosas se extienden fácilmente y rápidamente, por varias razones. (I) En muchos pacientes se ha debilitado la resistencia a las enfermedades infecciosas a causa de su dolencia (hospedadores comprometidos). (II) En los hospitales se trata a personas que padecen enfermedades infecciosas y estas pueden ser reservorios de patógenos altamente virulentos. (III) La aglomeración de pacientes en las habitaciones y en los consultorios aumenta la probabilidad de infecciones cruzadas. (IV) El personal del hospital se mueve de un interno a otro, aumentando la probabilidad de transferencia de patógenos. (V) Muchos procedimientos hospitalarios tales como la cateterización, la inyección hipodérmica, la punción lumbar y la recogida de muestras de tejidos (biopsias) o fluidos, llevan inherente el riesgo de introducir microorganismos patógenos en el hospedador. (VI) En las salas de maternidad de los hospitales, los niños recién nacidos son especialmente susceptibles a ciertas clases de infección porque carecen de un sistema inmunitario bien desarrollado. (VII) Los procedimientos quirúrgicos constituyen un importante riesgo porque no sólo exponen órganos internos a las fuentes de contaminación, sino que además el estrés de la cirugía disminuye la resistencia del paciente a la infección. (VIII) Muchos de los fármacos utilizados para la inmunodepresión (por ejemplo en los procedimientos de trasplante de órganos) aumentan la susceptibilidad a la infección. (IX) El uso de antibióticos para controlar la infección conlleva el riesgo de seleccionar microorganismos resistentes a antibióticos, que luego no pueden ser fácilmente controlados si producen una infección posterior (32).

1.4 Agentes etiológicos de las infecciones intrahospitalarias (IH)

Un número relativamente limitado de microorganismos son los agentes de la mayoría de las infecciones hospitalarias. Tal es el caso de *Escherichia coli*, presumiblemente introducido a partir de la microbiota normal, es el agente etiológico común de las infecciones de las vías urinarias en los hospitales, pero otras bacterias Gram negativas y *Pseudomonas aeruginosa* también están implicadas con frecuencia; así como también la levadura *Candida albicans* (14). Este microorganismo tiene una incidencia de 30 a 66 infecciones por millón de personas. Las especies incluidas en este género constituyen la cuarta causa más frecuente de infecciones nosocomiales septicémicas, adquiridas en

el hospital. Entre 1980 y la actualidad, la frecuencia de infecciones hospitalarias por esta bacteria se ha incrementado a un ritmo constante en hospitales de cualquier tamaño y en todos los grupos de edades. *Candida albicans* es la especie aislada con una mayor frecuencia a partir de muestras clínicas y generalmente representa entre un 90% y un 100% de las cepas aisladas de muestras de mucosa, y entre un 50% y 70% de las cepas procedentes de pacientes con infecciones hospitalarias (27).

Además de *Candida albicans*, uno de los patógenos hospitalarios más importantes y extendidos es *Staphylococcus aureus*. En la mayoría de los casos está asociado a la sangre (septicemia), heridas quirúrgicas e infecciones del tracto respiratorio bajo y constituye un problema especial en las contagios de los recién nacidos en el hospital. Aunque sólo las cepas coagulasa positivas de *Staphylococcus aureus* se consideraban en el pasado como cepas patógenas, actualmente un grupo de otras cepas de *Staphylococcus* spp. la mayoría coagulasa negativas, como es el caso de *Staphylococcus saprophyticus* y *Staphylococcus epidermidis*, constituyen colectivamente la etiología más común de las septicemias adquiridas en los hospitales y son también responsables de muchas infecciones producidas en las heridas. Estos estafilococos colonizan habitualmente las vías respiratorias altas, generalmente los conductos nasales, y con frecuencia se establecen como biota normal del personal hospitalario. En las poblaciones sanas pueden no causar enfermedad, pero estos portadores sin síntomas pueden ser fuente de infección para los pacientes.

Pseudomonas aeruginosa es otro patógeno no menos importante, porque clínicamente produce infecciones en el tracto respiratorio inferior y en las vías urinarias. También está presente muchas veces en pacientes quemados, que han perdido la barrera primaria que impide las infecciones de la piel. *Pseudomonas aeruginosa* presenta una de las propiedades más decisivas para el control de las infecciones nosocomiales y que dificulta su tratamiento, la resistencia a los antibióticos. Los aislamientos de esta bacteria procedente de pacientes con infecciones hospitalarias son generalmente resistentes a muchos antibióticos. Un grado algo menor de resistencia se ha observado entre los aislamientos de *Staphylococcus aureus*. También se pueden encontrar con cierta frecuencia muchas cepas muy resistentes. Las bacterias patógenas resistentes a los

antibióticos presentes en los hospitales, generalmente contienen plásmidos que codifican resistencia múltiple a antibióticos (32).

Este es un problema que nos afecta directamente y que puede provocar una grave crisis sanitaria a corto plazo. Uno de los mecanismos de resistencia que adquieren las bacterias se basa en la síntesis de unas moléculas, conocidas con el nombre beta-lactamasas, que reaccionan con las penicilinas, transformándolas en sustancias que no tienen acción antimicrobiana (51).

Sin embargo cabe mencionar que en este tipo de infecciones, también se aíslan con mayor frecuencia bacilos Gram negativos. Las enterobacterias son responsables del 80% de las infecciones del tracto urinario, también se aíslan de entre el 40 y 60% de las neumonías adquiridas en los hospitales (24). Este tipo de microorganismos son muy importantes porque son grandes productores de enzimas beta-lactamasas (enzimas capaces de modificar químicamente el anillo betalactámico que caracteriza a un amplio grupo de antibióticos) y que son capaces de inactivar a las cefalosporinas de 3ª generación, lo cual es un serio problema en el tratamiento de las sepsis nosocomiales que atentan directamente contra la eficacia de los antibióticos. Las infecciones constituyen un problema de salud que se intensifica en las áreas de atención al paciente grave donde los factores de riesgo son más frecuentes. Formando parte de los agentes causales, las enterobacterias (una gran familia de bacilos, Gram negativos, anaerobios facultativos, miembros de la flora intestinal normal), tienen una representatividad importante y son de los que más mecanismos de resistencia contra antibióticos betalactámicos han creado. Dentro de estos mecanismos de resistencia se describen la producción de beta-lactamasas, alteraciones de la permeabilidad, alteraciones de los sitios dianas y presumiblemente expresión de bombas de eliminación activa (25).

Dentro de estas enterobacterias, se encuentran también *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Citrobacter*, *Enterobacter* y *Proteus*, que son capaces de inactivar a las penicilinas y a las cefalosporinas de primera y segunda generación, a las oximinocefalosporinas y al aztreonam, pero en general, los pacientes con infecciones graves por una cepa de estas, tratados con antimicrobianos frente a los que posee resistencia de alto nivel, tienen mal pronóstico, con una mortalidad elevada, superior al 30%

siendo en algunas series hasta el 100%. Las enterobacterias tienen un valor importante dado la elevada frecuencia de bacterias causantes de infección y mortalidad en los pacientes que son atendidos, porque pueden llevar al fracaso la terapéutica antibiótica (20).

La elevada frecuencia de estos microorganismos en los pacientes desde su ingreso y su alta resistencia antibiótica, justifica desarrollar nuevas investigaciones que permitan su detección y con ello una terapéutica más eficiente y económica (20).

Por esta razón, los patógenos de la microbiota son tan importantes en este tipo de (IH), y es necesario encontrar diversas alternativas, entre las cuales están las de origen natural que actualmente tienen un gran impacto en el sector salud, como es el caso del Propóleo, ya que presenta efectos adversos mucho menos agresivos en comparación a otros medicamentos, baja toxicidad, y lo más importante no se ha encontrado evidencia de desarrollo de resistencia bacteriana al extracto, lo que representa una alternativa de tratamiento definitivamente más económica en comparación con muchos fármacos.

Tabla 1.- Distribución de las infecciones nosocomiales (32).

Patógeno	Infección del tracto urinario (%)	Heridas quirúrgicas (%)	Tracto respiratorio (%)	Septicemia (%)
<i>Escherichia coli</i>	26	10	6	6

<i>Enterococcus</i>	16	3	2	8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12	8	17	4
<i>Staphylococcus aureus</i>	2	17	16	16
<i>Staphylococcus</i> spp. (coagulasa negativos)	4	12	2	27
<i>Candida</i> spp.	9	2	5	8
<i>Streptococcus</i> spp.	0	3	1	4
Otros microorganismos Gram negativos	20	18	26	12
Otros microorganismos	11	27	25	15

1.5 Enfermedades infecciosas en países subdesarrollados

En las regiones del mundo en desarrollo, las enfermedades infecciosas son responsables de aproximadamente el 40% de las muertes. De los aproximadamente 38.5 millones de muertes por año, unos 17.5 millones se atribuyen a tuberculosis, enfermedades entéricas, respiratorias y a otras, todas ellas, en su mayoría tienen lugar entre los niños y los lactantes, como mencionamos anteriormente, además de los bajos niveles de protección sanitaria, la falta de recursos económicos son también un factor muy importante en esta situación, porque al tratar de adquirir ciertos medicamentos pueden resultar ser excesivamente costosos e inaccesibles, lo que permiten poner en primer lugar a las enfermedades infecciosas, que de acuerdo a ciertas estadísticas sobre la incidencia de las enfermedades, a nivel mundial siguen siendo un importante problema sanitario (32).

1.6 Infecciones respiratorias

Además de esta situación, estudios recientes, demuestran que las infecciones respiratorias siguen en frecuencia a las infecciones de las heridas mencionadas

anteriormente, la neumonía es la forma más frecuente de presentación y más del 90% de los casos ocurren en pacientes con patología pulmonar subyacente, entre los patógenos relacionados con este tipo de infección se encuentra *Pasteurella multocida*, la cual corresponde a la especie más frecuentemente aislada en infecciones humanas por el contacto con animales (mordeduras, comida compartida y arañazos de animales), la cual acompaña 53% de los casos de meningitis, en el 24 % de las neumonías y en el 24% de los casos de artritis séptica, que suelen tener como factor predisponente la alteración hepática. *Pasteurella multocida* induce tres categorías de infección en el hombre: infecciones de piel y tejidos blandos, que son las infecciones más frecuentes, infecciones respiratorias e infecciones invasivas en progresión, las cuales se caracterizan por una intensa respuesta inflamatoria y expresión antes de las 24 hrs (27).

1.7 Enfermedades emergentes y resurgentes

Se sabe que la distribución de las enfermedades emergentes por el mundo puede variar de forma espectacular y rápidamente. Las alteraciones en el ambiente, en la población de hospedadores ó en el patógeno pueden contribuir a la rápida extensión de nuevas enfermedades con potencial para una elevada morbilidad y mortalidad entre los individuos infectados, nos referimos a enfermedades emergentes, las cuales no están limitadas a ser nuevas, sino que incluyen también el resurgimiento de enfermedades que se creía controladas, especialmente a medida que los antibióticos van siendo menos efectivos y los sistemas sanitarios fallan (32).

Uno de los factores responsables de la emergencia y resurgencia de nuevos patógenos, es la tecnología, de manera general el impacto que ha tenido es positivo, sin embargo, también ha contribuido a difundir enfermedades, como es el caso del ambiente para el cuidado de la salud, principalmente en los hospitales como ya hemos mencionado con anterioridad, y que ha dado como resultado un aumento en las infecciones nosocomiales, en la década de los años 1980, en los Estados Unidos se multiplicó por tres el número de bacteriemias asociadas a los hospitales. La resistencia a antibióticos en los microorganismos es otro de los logros negativos de las prácticas modernas para el cuidado de la salud. Los enterococos resistentes a la vancomicina y *Streptococcus* spp.

resistentes a varios fármacos se han convertido en importantes causas de enfermedades emergentes. *Streptococcus pyogenes* responsable de escarlatina, fiebre reumática y shock tóxico también se encuentra dentro de la lista de infecciones resurgentes (32).

El transporte, la elaboración a granel, y los métodos centrales de distribución, constituyen otro factor permisivo en esta situación. Estos son indispensables para asegurar la calidad y la economía en la industria alimentaria, también pueden incrementar la incidencia de epidemias con una fuente común, cuando fallan las medidas sanitarias, tal es el caso de una sola planta de distribución de carne que hizo llegar *Escherichia coli* O157:H7 al menos a 500 individuos de cuatro estados de los Estados Unidos, provocando la muerte de varias personas (32). El incumplimiento de estas medidas sanitarias es, a veces, responsable de emergencia o del resurgimiento de enfermedades, el cólera, cuyo agente etiológico es *Vibrio cholerae*, en una contaminación de los abastecimientos municipales de agua en el Perú, condujo en 1991 a una importante pandemia de cólera que afectó a unas 400,000 personas y murieron casi 4,000 (32). Sin embargo no es el único caso, el patógeno conocido como *Listeria monocytogenes* causa en E.U. listeriosis esporádica. Se han reconocido prolongadas epidemias frecuentemente caracterizadas por la alta tasa de mortalidad. Hubo una epidemia durante el invierno de 1998 al 1999 con más de 100 casos y 21 muertos en 22 estados ligado al consumo de embutidos. Este brote enfatizó la importancia de *Listeria monocytogenes* como patógeno de los alimentos y remarca la necesidad de prevenir la listeriosis, fundamentalmente en los grupos de riesgo. Los estudios epidemiológicos implican a los alimentos como el vehículo más común para la transmisión de la listeriosis humana, y han mostrado concluyentemente que tanto la enfermedad esporádica como la epidémica son mayormente debidas a la transmisión por alimentos, aunque también es considerada una zoonosis. La incidencia anual de listeriosis es de 0.7 por 100,000, aunque la tasa anual de infección es 3 veces más alta en mayores de 70 años y 17 veces más alta en embarazadas, tiene una alta tasa de mortalidad de alrededor del 23% y es uno de los motivos que concita su interés (5).

Datos obtenidos del Centro Nacional de Referencia del Instituto Pasteur de París en el año 2000 mostraron un total de 216 casos de listeriosis que por su presentación clínica

se distribuyeron de la siguiente forma: 48 casos (22%) correspondieron a infección materna y neonatal, 168 (78%) casos correspondieron a infecciones no maternas ni neonatales. Dentro de estas últimas 116 casos (65%) fueron atribuidos a bacteriemias y sepsis, 42 casos (25%) correspondieron a infecciones de sistema nervioso central y 16 casos (10%) a otros procesos (54).

Estos factores son importantes para el brote de enfermedades ya sean resurgentes o emergentes, sin embargo la adaptación y los cambios microbianos, también lo son. Uno de los principales problemas es el reconocimiento de ciertos patógenos como potenciales zoonóticos, un claro ejemplo de esta situación es el ocurrido durante los últimos años, en donde fueron más frecuentes los casos clínicos comunicados en humanos relacionados a infecciones por corinebacterias, siendo consideradas como patógenos oportunistas. Esto podría deberse posiblemente a: el aumento de personas inmunocomprometidas, a que durante años anteriores se subestimó el potencial patógeno de este género y por el interés que ha surgido en la taxonomía de este grupo bacteriano. Actualmente la infección por *Corynebacterium pseudotuberculosis* ha sido reconocida como una enfermedad zoonótica emergente. En general, las infecciones en humanos son raras y usualmente se presentan como pseudotuberculosis adquirida por exposición ocupacional. La mayoría de los casos que se han comunicado, en trabajos de divulgación científica, se refieren a habitantes de países con gran actividad en ganadería ovina como Australia y Nueva Zelanda; y pocos casos se manifestaron en otros países como Estados Unidos, Francia, Panamá y España. Además que la pseudotuberculosis es una enfermedad de importancia a nivel mundial debido a la alta prevalencia y por originar grandes pérdidas económicas en la ganadería ovina y caprina. Es considerada una de las enfermedades más importantes, desde el punto de vista económico, que afecta ovejas y cabras en países como E.U., Canadá y Australia, habiéndose comunicado para Australia una pérdida en la producción de lana de 17 millones de dólares (16).

Una de las intervenciones más importantes para evitar que las infecciones emergentes se propaguen, es el desarrollo de vacunas y drogas baratas y eficaces, con una posibilidad casi nula de que el patógeno desarrolle resistencia en contra de esta.

1.8 El Propóleo

En prácticamente todos los países del planeta, o al menos en los más desarrollados económicamente, el Propóleo está legalizado para el consumo humano. En algunos casos como producto medicinal (que esencialmente lo es), en otros como producto alimenticio (aunque encubiertamente se lo consume como medicamento natural), dermatológico, cosmético ó como medicamento. En algunos países de sudamérica es considerado como producto natural, siendo esta clasificación de los productos única en el mundo (34).

El Propóleo es una mezcla de resinas (de diferentes plantas, cortezas, hojas, flores y frutas), cera natural producida por las abejas melíferas y, en ocasiones, granos de polen recolectados por éstas. Una vez colectado este material es enriquecido con saliva y secreciones enzimáticas de las abejas (26) (27).

1.8.1 Antecedentes del Propóleo

El término Propóleo proviene del griego propolis (pro: delante o en defensa de, y polis: ciudad: delante de la ciudad, es decir, de la colmena) y es utilizado en su acepción original, sin mutación alguna en casi todas las lenguas indoeuropeas (2).

La referencia más remota sobre las abejas se encuentra en las pinturas rupestres de la Cueva de la Araña, en Valencia España (Datan aproximadamente del año 7 A.C.), en las que puede apreciarse un ejemplo de la añeja relación entre hombres y abejas (19).

Desde la antigüedad en la apiterapia, se han usado productos de abeja como son: miel, Propóleo, polen, veneno, cera, jalea real para prevenir ó tratar enfermedades y promover la salud. Las raíces de la apiterapia se remontan a más de 6,000 años atrás de medicina en el antiguo Egipto, los cuales conocían acerca de los beneficios del Propóleo en África. Los griegos y los romanos utilizaron productos de abeja con propósitos medicinales y sabían que el Propóleo cicatrizaba heridas en la piel. Esto es descrito por Hipócrates (370-460 D.C.), Aristóteles (332-384 D.C.) y Galeno (130-200 A.C.), ellos prescriben el uso de miel y veneno en la cura de calvicie (23).

Aristóteles ya hablaba del Propóleo y lo consideró como remedio para infecciones de la piel, llagas y supuraciones. Galeno, en el siglo II, menciona al Propóleo en sus trabajos así como el filósofo persa Avicena. En documentos del siglo XII, son descritas las preparaciones medicinales con Propóleo para el tratamiento de caries en la boca e infecciones en la garganta. Los Incas lo utilizaban cuando se presentaba un cuadro de infecciones febriles y los franceses en los siglos XVII y XIX para el tratamiento de llagas. También se empleó en África del sur en la guerra de Bornes en el año 1,900 para tratar heridas y como cicatrizante (8).

El cuidado y aprovechamiento de los productos de las abejas en México, se remonta a épocas prehispánicas donde las diferentes culturas existentes tales como los Mayas, Tarascos, Lacandones, Olmecas y Populucas cultivaban a las abejas sin aguijón (Meliponinos), con fines alimenticios, medicinales y religiosos (35).

1.8.2 Composición química

El Propóleo es producido por abejas ya sea de resinas y/o exudados de plantas, el color, la consistencia y la composición química están íntimamente relacionadas con la flores visitadas por las abejas y la estación durante la cual es colectado (45).

La composición del Propóleo varía entre cada colmena, ya sea por la gran cantidad de ingredientes que lo conforman ó por la técnica de recolección utilizada por los apicultores. Para su obtención, la colmena es raspada, y por tanto, la cera (que es un aditivo) puede ser un componente significativo del mismo (1).



Figura 1.- Abeja *Apis mellifera* (19).

El Propóleo es una sustancia compleja, constituida por una gran variedad de compuestos químicos, su composición no es estable y varía según la fuente de procedencia, se caracteriza por tener un 55% de resinas y bálsamos aromáticos, 30% de ceras, 10% de aceites esenciales y 5% granos de polen, además de diversos materiales orgánicos y minerales. Entre los más de 160 compuestos identificados, un 50% son compuestos fenólicos a los que se le atribuye su acción farmacológica. (50)(6). Dentro de dichos fenoles, los principales son: flavonoides (flavonas, isoflavonas, flavononas), ácidos aromáticos y sus esteres (ácido cafeico, cinámico y otros), Aldehídos aromáticos (vainillina e isovainillina), cumarinas, triglicéridos fenólicos. Además, contiene provitamina A, algunas vitaminas del grupo B (especialmente la vitamina B3), diversas lactonas, polisacáridos y aminoácidos (6). Se han reportado alrededor de 38 flavonas, 12 derivados del ácido benzoico, 14 derivados del alcohol cinámico y el ácido cinámico, 12 componentes entre alcoholes, cetonas y fenoles, 7 terpenos, 11 esteroides, 7 azúcares y 2 aminoácidos (48).

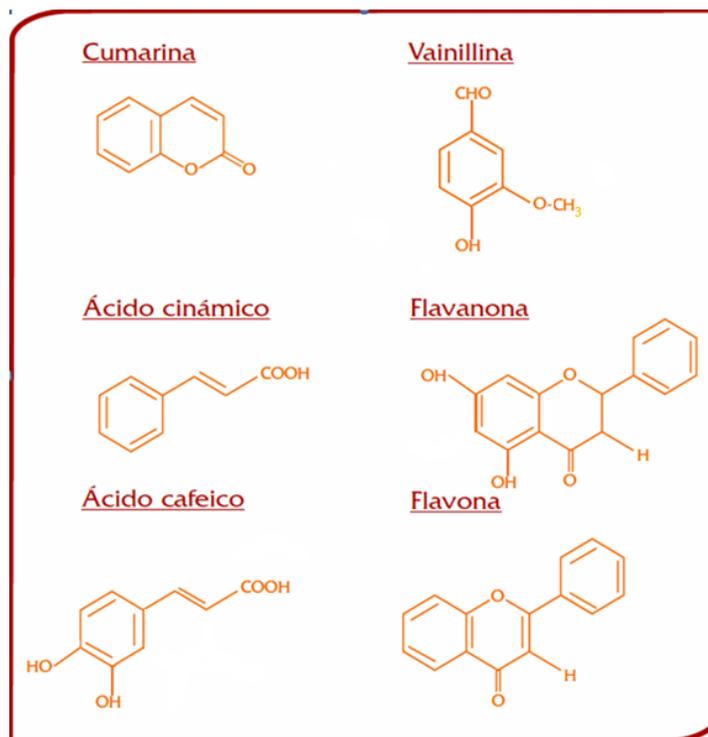


Figura 2.- Estructuras de algunos de los compuestos, identificados en el extracto de Propóleo, a los que se les atribuye actividad farmacológica (56).

Estos compuestos fenólicos, ó bien flavonoides, se encuentran en fracciones solubles de disolventes como el alcohol (etanol al 70%), se localizan en la mayoría de las plantas que integran la dieta humana y son solubles en agua, cambian de color (cuando se oxidan) y contienen grupos aromáticos conjugados que muestran bandas de absorción intensa, por lo tanto son detectados en cromatografías (47). Los flavonoides absorben radiación electromagnética en la zona UV-VIS y de esta forma representan una protección natural para las plantas contra la radiación UV del sol (47). Esto explica el efecto protector sobre la piel de ciertos preparados en base a propóleos (2).

1.8.3 Propiedades físicas

El color de los tipos del Propóleo va desde el color ámbar claro al café oscuro, pasando por el amarillo, el pardo y rojo. Esta variación en la coloración de los propóleos depende de la vegetación existente en las zonas donde se ubican las colmenas (48).

El Propóleo se disuelve fácilmente en éter y cloroformo, parcialmente soluble el alcohol, a temperaturas de 15°C es duro y quebradizo. A temperaturas más elevadas se ablanda y se vuelve pegajoso. Esta resina se funde entre 60°C y 69°C (35).

El Propóleo es tan suave y pegajoso a temperaturas elevadas, que incluso puede ser moldeado; en cambio, a temperaturas bajas y con el paso del tiempo se endurece (19).

1.8.4 Actividad biológica del Propóleo

El Propóleo potencializa los antibióticos, inhibe la aglutinación eritrocítica, es útil en quemaduras, heridas, afecciones de las encías, gripe, hemorroides, sus ácidos fenólicos tienen propiedades antidiabéticas e inhiben selectivamente células tumorales del melanoma (19).

Se ha observado actividad contra *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* y *Streptococcus mutans*; especies de bacterias Gram positivas, Gram negativas y levaduras; bacterias anaeróbicas de la cavidad oral humana; *Salmonella* spp. y una variedad de microorganismos incluyendo *Mycobacterium* spp. (33). Se ha reportado una gran actividad del Propóleo sobre el crecimiento de bacterias Gram positivas y existe una correlación de esta actividad con la presencia de los flavonoides. Dichos compuestos, también poseen propiedades biológicas, como: antioxidantes, antimicrobianas, antiinflamatorias, antialérgicas, antimutagénicas, anticlastogénica, antiséptica, antimicótica, bacteriostática, astringente, antiulcerosa, colerético, espasmolítico, anticarcinogénicas y propiedades anestésicas (27) (19), entre muchas otras aplicaciones.

Sus propiedades antimicrobianas están bien documentadas, por ejemplo, la flavona pinocembrina es activa contra gran variedad de bacterias y hongos. La asociación con la galangina y los ácidos cafeico y ferúlico es, probablemente, responsable de la mayoría de sus propiedades biológicas (46). La quercetina, es otra flavona con actividad antiviral que fortalece los capilares. Otras flavonas y flavononas del Propóleo tienen actividad antiinflamatoria, espasmolítica, efecto como anestésico

tópico, cicatrizante de úlceras gástricas, y como es esencial para activar la vitamina C, se le relaciona con la prevención del escorbuto (19).

El Propóleo brasileño es utilizado en aplicaciones tópicas como agente regenerador tisular, este es uno de muchos usos populares en el mundo actual. Aplicado tópicamente puede prevenir y tratar daños producidos en la piel. Recientemente el extracto de Propóleo adicionado a formulaciones tópicas muestra actividad antioxidante, protegiendo la piel del daño causado por radicales libres. La correlación que se observa entre la actividad antioxidante y la composición química de diferentes fracciones, tiene especial énfasis en la presencia de flavonoides y derivado de ácido p-cumárico. Los autores concluyen que los componentes de Propóleo actúan por diferentes mecanismos secuestrando especies reactivas de oxígeno (45). Se sabe que inhibe el crecimiento bacteriano, con mayor efecto en bacterias Gram (+) y con una acción limitada contra bacterias Gram (-). La actividad fungicida que posee, es sobre todo contra micosis superficiales. Modula *in vivo* e *in vitro* la producción de macrófagos y la acción del sistema de complemento que es receptor a estas células. Se ha observado que el ácido cinámico, uno de sus componentes, actúa sobre la defensa del hospedero, estimulando la proliferación de linfocitos e induciendo la producción de IL-1 e IL-2, también existe evidencia de la potencia que tiene contra cultivos de células cancerosas humanas ensayadas en el laboratorio (26).

1.8.5 Producción del Propóleo

Los principales países productores de Propóleo en el mundo son: China, Brasil, Argentina, Cuba, Chile, Uruguay y Canadá, así como, los países importadores que captan dicha producción son: Dinamarca, Francia, Alemania, Hungría, Ucrania y Estados Unidos de Norte América. Cabe señalar que el número de países consumidores de Propóleo va en aumento (35).

La limitada producción de Propóleo se debe también al tipo de apicultura practicado en nuestro país, la cual se enfoca principalmente a la extracción de miel. Paralelamente, el desconocimiento por parte de los apicultores de la técnica de extracción del mismo o en algunos casos el ignorar que dicha resina tenga algún valor

y por otro lado la falta de empresas que demanden la compra, contribuyendo al lento desarrollo de su producción y uso (35).

Existen diversos factores que determinan la producción de Propóleo en un apiario como son: la raza de las abejas, si la colonia presenta una conducta a propolizar o no (características genéticas de la colmena), la técnica de recolección utilizada por el apicultor, las condiciones ambientales y la flora circundante al apiario (35).

Actualmente se cuenta con diferentes técnicas de producción de Propóleo, desde el simple raspado de las paredes internas de la tapa, cuadros y caja, hasta el uso de mallas plásticas y diversos tipos de rejillas de madera (35).

1.8.5.1 Efecto de la raza de abejas en la producción del Propóleo

Las abejas *Apis mellifera caucásica* y *Apis mellifera intermissa* son consideradas altamente propolizadoras, ya que forman cortinas de Propóleo que bloquean la entrada a la colmena, permitiendo tan sólo el paso de una abeja. Del mismo modo *Apis mellifera scutellata*, abeja del interior árido del África, elabora cortinas de Propóleo sin embargo, las abejas de la misma especie, que se localizan en la región de la costa, dejan permanentemente la entrada abierta (35).

Caso contrario sucede con las abejas italianas *Apis mellifera lingustica*, las cuales son escasamente propolizadoras. Por otra parte, se menciona que las abejas carniolas *Apis mellifera carnica* utilizan poco Propóleo, empleando cera en su lugar. Las abejas africanizadas presentan un comportamiento propolizador mayor que las abejas europeas, particularmente las italianas (35).

1.8.5.2 Técnicas de recolección

La recolecta del Propóleo se lleva a cabo por un número reducido de abejas (de más de 15 días de vida) y es realizada durante las horas más calientes del día, por lo regular de las 10:00 a las 15:30 hrs. Cada abeja después de haber localizado con sus antenas la partícula más adecuada de resina en alguna planta, procede a desprenderla valiéndose de sus mandíbulas y del primer par de patas, auxiliándose con la secreción de sus

glándulas mandibulares (ácido 10-hidroxi-2-decenoico), le permite el ablandamiento de la goma. Posteriormente la abeja tritura y moldea con sus mandíbulas el pedazo arrancado y utilizando una de las patas del segundo par, lo transfiere a la corbícula del tercer par de patas, dicha acción la puede efectuar en el lugar de colecta o en pleno vuelo. Para completar una carga de Propóleo (llenar las dos cestillas de su tercer par de patas), una abeja se lleva 15 min a una hr, dependiendo principalmente de la temperatura ambiente. Cabe mencionar que la temperatura por debajo de los 21°C y por arriba de los 28°C, parece inhibir este comportamiento (35).

Se deben seleccionar colonias fuertes y que se muestren propolizadoras. Este es un carácter genético. Conviene por ejemplo colocar las colmenas en zonas de reforestación, con las piqueras orientadas hacia el viento (15).

1.8.5.2.1 Raspado

Consiste básicamente en el raspado del interior de la tapa, y bordes de la caja y bastidores, al igual que de la cámara de cría, utilizando como herramienta, una cuña o alza prima de acero inoxidable. La cuña debe ser limpiada antes de proceder a raspar otra colmena con el fin de evitar transmitir una enfermedad de una colonia a otra (32). El raspado se debe efectuar por la mañana cuando la temperatura ambiente se encuentra más baja (cuando el Propóleo se encuentra duro y quebradizo), para que se facilite la extracción, ya que al incrementarse la temperatura ambiente, el Propóleo tiende a volverse blando y pegajoso (35).

Para forzar a las abejas a producir más Propóleo, algunos apicultores, crean aberturas de uno a dos centímetros aproximadamente, entre la tapa y la caja, con la ayuda de guijarros o madera, que las abejas tendrán a tapar (35).

Cabe señalar que el Propóleo obtenido por esta técnica, es de baja calidad, por la alta cantidad de impurezas presentes en el mismo, las cuales se encuentran constituidas por astillas de madera, partes de abejas y cera, principalmente. Si las colmenas de las cuales se van a extraer el Propóleo están pintadas, se debe tener cuidado al efectuar el raspado, ya que la contaminación del mismo con pintura lo hará inutilizable (35).

1.8.5.2.2 Rejillas

Existen diferentes tipos de rejillas, de las cuales podemos citar las siguientes:



Figura 3.- Uso de rejillas para la recolección de Propóleo en la colmena (15).

Rejilla de Sadovnikov.- Esta formada por listones de madera de 12mm formando ángulos. Otra variante de esta rejilla es un cuadro o bastidor con las mismas características de elaboración que la anterior. La diferencia se encuentra en que la primera se coloca entre la tapa y la alza y la segunda como un bastidor en el extremo interno de la alza (35).

Rejilla de Matsniev.- Está formada por listones de madera de 47mm de longitud y de 10 a 12mm de anchura y cinco de espesor. Por los lados de los listones tiene un desbaste que crea hendiduras de uno a tres mm. Está rejilla se coloca entre la tapa y el alza de la colmena (35).

Rejilla de Atnashev.- Elaborada de madera de pino y cuyas partes van ensambladas (listones de madera), mediante un pasador de acero inoxidable que las fija transversalmente, se coloca igual que las anteriores (35).

Rejilla de Shtan.- Consta de un marco de madera, en cuyos lados opuestos se han abierto orificios donde se introducirán listones de madera que formarán rendijas de tres a cuatro mm de anchura y se coloca en lugar de la tapa (35).

La extracción del Propóleo de las rejillas es mediante raspado de los listones. El Propóleo producido es de menor calidad que el obtenido del raspado de los cuadros, alza y tapa (35).

1.8.5.2.3 Mallas plásticas

El uso de esta técnica conlleva la aplicación de más esfuerzos por parte del apicultor, debido a que las mallas plásticas deben de ser cortadas a 41 cm de ancho por 51 cm de largo, posteriormente pesadas y colocadas entre la caja y la tapa de la colmena dejándola por un periodo de dos meses, efectuando inspecciones periódicas con el fin de verificar el proceso de propolización de la misma. Al cabo de este tiempo la malla es retirada y pesada, enrollándose y amarrándose con un liga de hule o un hilo de algodón, guardándola en una bolsa de plástico para evitar la contaminación de la resina, posteriormente, se deposita en un congelador a -20°C de temperatura por un período de 24hrs. Al término de este tiempo la malla es retirada y en una mesa limpia, cubierta con papel estraza, se desenrolla y se procede a la extracción de propóleos mediante la fricción de la malla consigo misma. En cada malla se puede llegar a coleccionar hasta 100g de Propóleo.

Cabe señalar que las mallas utilizadas no deben de presentar orificios mayores de dos milímetros. Las redes plásticas con orificios de tres milímetros, son ampliamente usadas en Hungría. Algunos autores recomiendan las redes de nylon con orificios de 1.6 a 2.4mm, reportando una producción de 50g por colmena entre los meses de junio a noviembre. Durante el verano la producción por colonia va desde los 10g hasta los 158g (35).

1.8.5.2.4 Colmena Propolizadora Inteligente (CPI)

Esta técnica constituye una respuesta afectiva que revolucionará la producción del Propóleo, de ahí que alcanzara el primer lugar en el concurso de Innovaciones Tecnológicas durante el Congreso Brasileño de Apicultura, celebrado en Teresina, Piauí, en 1996.

La CPI es una colmena Langstroth adaptada especialmente para estimular el instinto propolizador de las abejas a través de aberturas regulares en los laterales del sistema. El principio es muy simple, pero demanda una asistencia intensiva y regular a las colmenas. En condiciones ópticas una buena colmena puede producir hasta 600g de Propóleo por mes (35).

1.8.5.2.4.1 Colmena Pirassununga

Este tipo de colmena fue inventado por el Pirassununguense Carlos Eduardo Conceicao. Tiene la forma de un estuche que va acoplado a las cajas de la colmena. El objetivo de este tipo de colmena es el de incitar a las abejas a producir Propóleo. Tiene una abertura inicial de dos centímetros ubicada en el centro de las caras laterales de la caja. Esta abertura estará propolizada en aproximadamente una semana. Cada semana se deberá cortar la barra propolizada sin desprenderla, esto con la finalidad de ampliar nuevamente la abertura dos cm más por lado para alcanzar cuatro cm. Y en un plazo de 26 a 30 días dependiendo de las condiciones climáticas se tendrá una barra totalmente propolizada con un peso aproximado de 100g que puede ser retirada de la colmena. En un caso ideal, con una colmena bien fuerte, 3 alzas melarias bien pobladas con unas 80.0000 abejas, se puede llegar a rendimientos mensuales de 600 gramos (35).

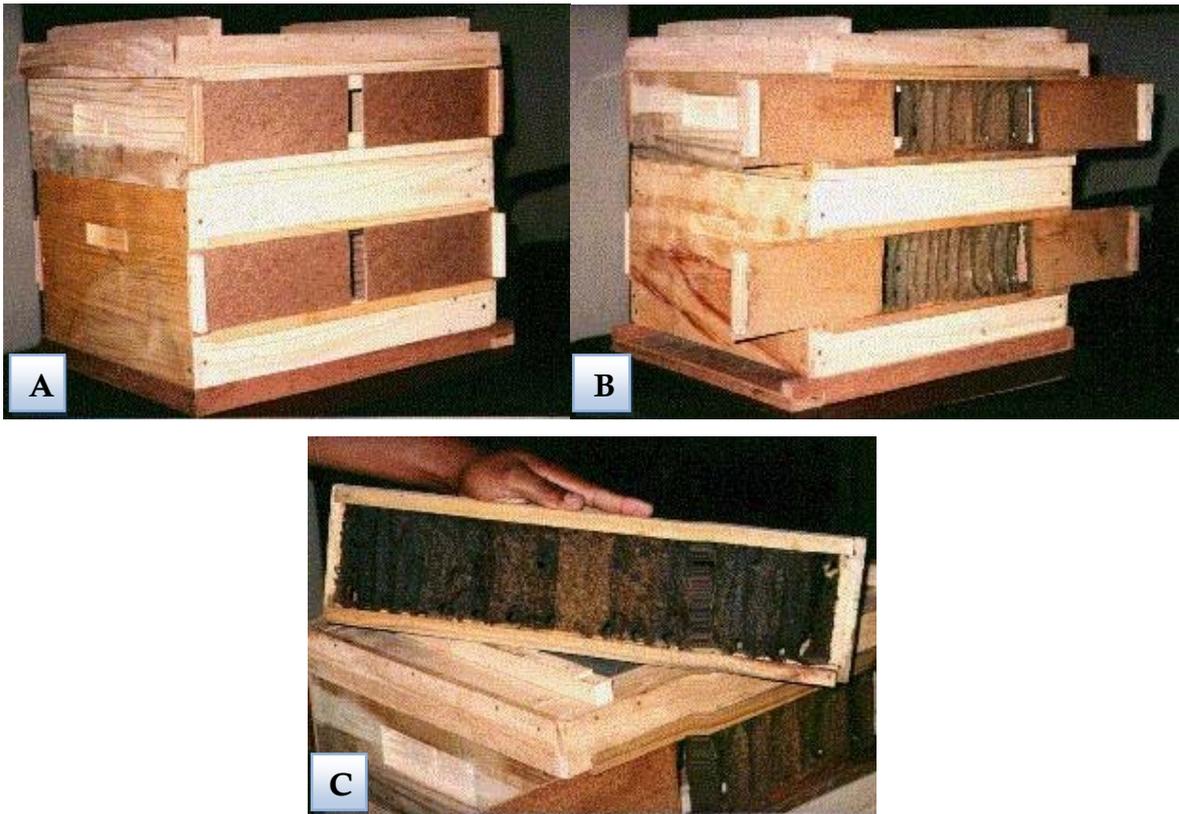


Figura 4.- (A) El estuche adaptado, sobre cámara de cría y alza melaria, con su abertura inicial; **(B)** Cortina de Propóleo formada; **(C)** Cortina de Propóleo formada (15).

1.8.6 Almacenamiento del Propóleo

El Propóleo obtenido por cualquiera de las técnicas citadas no debe ser comprimido formando bolas, ya que deberá limpiarse manualmente, con el fin de retirar las impurezas presentes en el mismo, como lo son, partes de abejas, astillas de madera y cera. Posteriormente se deposita en bolsas, frascos de plástico o frascos de vidrio color ámbar, guardándolo a la sombra o en refrigeración (35).

1.8.7 Uso del Propóleo dentro de la colmena

Los efectos antibacteriales, antivirales y antifúngicos del Propóleo representan una gran ventaja para proteger a la colonia contra enfermedades.

Es sumamente activo contra el agente etiológico *Paenibacillus larvae*, de la loque americana (enfermedad que afecta a las larvas de las abejas) (19). El uso del Propóleo

puede reducir el riesgo de infección en el desarrollo de larvas y el crecimiento de bacterias en tejido animal en descomposición.



Figura 5.- Las abejas frecuentemente utilizan el Propóleo para reducir de tamaño de la entrada a la colmena y protegerla (51).

Las abejas elaboran el Propóleo de forma instintiva para emplearlo como medio de defensa frente al medio externo. Así gracias a esta sustancia, garantizan la asepsia en el interior de la colmena, algo tan necesario para salvaguardar la supervivencia de 60,000 abejas que conviven en un espacio tan reducido, junto a las crías y alimento (56).

Por sus propiedades antimicrobianas representa una parte importante del arsenal químico de la colmena para combatir la contaminación y la invasión de agentes patógenos. Todas las especies de *Apis* y muchas especies de abejas sin aguijón (Meliponas y Trigonas, entre otras) recolectan Propóleo. Sin embargo, éstas reúnen grandes cantidades de resinas vegetales, gomas y exudados, que al ser incorporados a la cera producen cerumen, material usado para la construcción del panal (46), con el

fin de: sellar, cubrir, tapar las grietas, para evitar la entrada a la colmena de otros insectos invasores y protegerse del frío a manera de una delgada capa de barniz sobre la superficie de los panales (56) (19).

Las abejas utilizan el Propóleo para barnizar el interior de la colmena (incluidos los panales) con fines desinfectantes, cerrar grietas, reducir vías de accesos y consolidar los componentes estructurales. También es utilizado para recurrir los cadáveres de los enemigos que se hayan introducido en la colmena (escarabajos, roedores, lagartijas, etc.) que quedan embalsamados evitando su descomposición (50).

1.8.8 Uso comercial del Propóleo

El Propóleo es usado actualmente en Norteamérica, como suplemento natural y en medicina complementaria. En tabletas puede ser combinado con gran variedad de ingredientes como polen y jalea real; en tinturas, puede ser extraído con alcohol al 70%; como aditivo, en lociones para la piel, cremas de belleza, jabones, lápices labiales, shampoo, gomas de mascar, cremas dentales y enjuagues bucales. También se utiliza en barnices especiales para la preservación de contenedores rotos ó canoas (35).

En México, diversos investigadores y apicultores se han enfocado a la tarea de estudiar y validar el Propóleo, en la producción de formulas medicamentosas, nutritivas y cosméticas, logrando obtener preparados especiales de precisa dosificación como lo son: tinturas, extractos, cremas, ungüentos, cápsulas y pastillas, entre otras formas de productos terminados (35).



Figura 6.- Algunos de los usos comerciales del Propóleo (19).

Como estimulante del crecimiento animal, ha recibido poca atención; sin embargo, en aves se reporta una ganancia de peso (mayor del 20%), cuando se proporciona en la dieta a razón de 500 partes por millón.

1.8.9 Valor económico del Propóleo

Según informes confiables en el “mercado real” el Propóleo ocuparía el segundo lugar en importancia en las transacciones internacionales, dentro de los productos de la colmena. Según estos informes el primer producto sería el veneno de abejas (elemento este que “mueve” muchos millones de dólares entre los Países del denominado Primer Mundo Económico y cuyo destino es, obviamente, la industria farmacéutica de avanzada) y recién en tercer lugar estaría la miel (38).

El precio del Propóleo fluctúa considerablemente. En los Estados Unidos y Canadá, oscila de dos a seis dólares por libra, en contraste con Nueva Zelanda, donde alcanza 26 dólares la libra. En México tiene un valor de 500 pesos el kilogramo en greña (obtenido del raspado) (19).

Tabla 2.- Oferta y demanda de los productos de la colmena en el país (35).

OFERTA Y DEMANDA DE PRODUCTOS DE LA COLMENA (O) Ofrece R (Requiere)			
Enrique Carrillo Pérez Av. Cuauhtémoc 115-14 Cuernavaca, Mor.	01-777-318-81-26	(R) Miel (R) Cera en Marqueta (R) Cera Estampada (O) Polen (R) Propóleos (R) Reinas (R) Núcleos	5 Ton 500 Kg 150 Kg. 18 Kg. 10 Kg. 200 500
Luis Santana Colector Paracho 2 Col. Lázaro Cárdenas Cuernavaca, Mor	01-777-318-75-60	(O) Miel (O) Cera en Marqueta (O) Cera Estampada (O) Reinas (O) Núcleos	6 Ton 200 Kg 160 Kg. 1,500 180
Productos del Colmenar Calle 10 de Abril 23 Xoxocotla Puente de Ixtla, Mor	01 734 345 50 55	(O) Miel (D) Cera en Marqueta (D) Polen (O) Reinas (O) Núcleos	5 Tambores 2,000 Kg 100 Kg. 1,200 100
Alberto Colector Hinojos Ignacio Bastida 19 Col. Otilio Montaño Yautepec, Mor	01 322 18 03	(O) Miel (O) Cera en Marqueta (O) Cera Estampada (O) Polen (O) Propóleos (O) Reinas (O) Núcleos	260 Cubetas 250 Kg 250 Kg. 150 Kg 50Kg 300 300
RUCKER DE MÉXICO Av. Lázaro Cárdenas 57 entre Hidalgo y Autopista México-Tres Marías Tres Marías, Huitzilac, Mor.	01-739-393-05-05	(O) Cera en Marqueta (O) Cera Estampada (O) Polen (O) Propóleos (O) Reinas (O) Núcleos	50 Kg 100 Kg. 200 Kg. 10 Kg. 400 500
Apícola del Oriente de Morelos Carretera Amayuca Jonacatepec Jantetelco, Mor	01 735 355 06 07	(O) Miel (O) Cera Estampada (O) Reinas (O) Núcleos	12.5 Ton 100 Kg. 300 500
Ing. José Luis García Nava Nicolás Bravo 262 Tecoman, Col.	01-313-324-05-07 01-313-325-28-53 luisgen@ucol.mx	(O) Miel (O) Cera Marqueta (O) Cera Estampada (O) Polen (O) Propóleos (O) Jalea Real Celdas (O) Reinas (O) Núcleos	15 Ton. 400 Kg 2 Ton. 1.5 Ton 12 Kg 1000 (c/mes) 400 (mensuales) 400 (anuales)
Alba Gisela Alcaraz López Tabasco 186 Tecoman, Col.	01-313-324 33-02 01-313-325-28-53 mielsantarosa@hotmail .com	(O) Miel (O) Cera Marqueta (O) Propóleos (O) Polen (O) Núcleos	6.4 Ton. 150 Kg 60 Kg 500 Kg 100 (anuales)
Ing. Juan Fernando Hernández García Amapola S/N Suchitlan, Comala, Col.	01-313-395-44-00 01-313-394-44-00 zangano_rey@hotmail. com	(O) Miel (O) Cera Marqueta (O) Cera Estampada (O) Polen (O) Propóleos (O) Jalea Real (O) Reinas (O) Núcleos	2.5 Ton. 25 Kg 40 Kg 250 Kg. 75 Kg 12 Kg 150 (mensuales) 50 (anuales)

2. JUSTIFICACIÓN

Según datos de la Organización Mundial de la Salud, más del 80% de la población del planeta depende del uso de plantas silvestres para la atención de enfermedades. Tanto en los países pobres, donde la fitoterapia constituye prácticamente la forma de tratamiento más económica y arraigada en la cultura popular, como en los altamente industrializados, las plantas son fuente de obtención de medicamentos. Los productos naturales han sido una fuente muy rica de productos bioactivos prototipo para la obtención de fármacos con actividad biológica de gran potencia y baja toxicidad.

El peso que tiene la investigación de los Productos Naturales en México y en el mundo es considerable; en nuestro país esto es debido en parte a la gran riqueza y biodiversidad vegetal, así como por los antecedentes de la medicina prehispánica y de la herbolaria.

La actividad del Propóleo se estudia en hongos virus y bacterias siendo de alta importancia esta última debido al incremento de la resistencia bacteriana a los antibióticos conocidos por múltiples cepas en la actualidad. La información disponible acerca de esto varía con las muestras de Propóleo por lo que es significativo trabajar con productos de México que puedan aportar información a lo que se ha recabado en otras partes del mundo.

Debido a la variedad de métodos de extracción los trabajos refieren a distintos efectos en sus fracciones acuosas o etéreas y existe gran interés en estandarizar los estudios y dar una ruta clara y que sea ejecutable para estudios confiables.

El avance de los estudios en materia de productos como el Propóleo significa un avance en el desarrollo de técnicas y actualización de la información disponible puesto que enfoca detalles que son de importancia por su apertura a nuevos temas a cuestionar y seguir.

Dado el caso el presente estudio informa y define líneas de investigación dentro del estudio del Propóleo Mexicano por su variedad de cepas y la practica extracción realizada en el proceso.

3. HIPÓTESIS

Si el extracto de Propóleo tiene efecto sobre las bacterias de importancia clínica ensayadas entonces será posible determinar la CMI, CBM y el posible daño estructural ocasionado por dicho extracto.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

- ✓ Evaluar la actividad antimicrobiana del extracto de Propóleo en bacterias de importancia clínica.

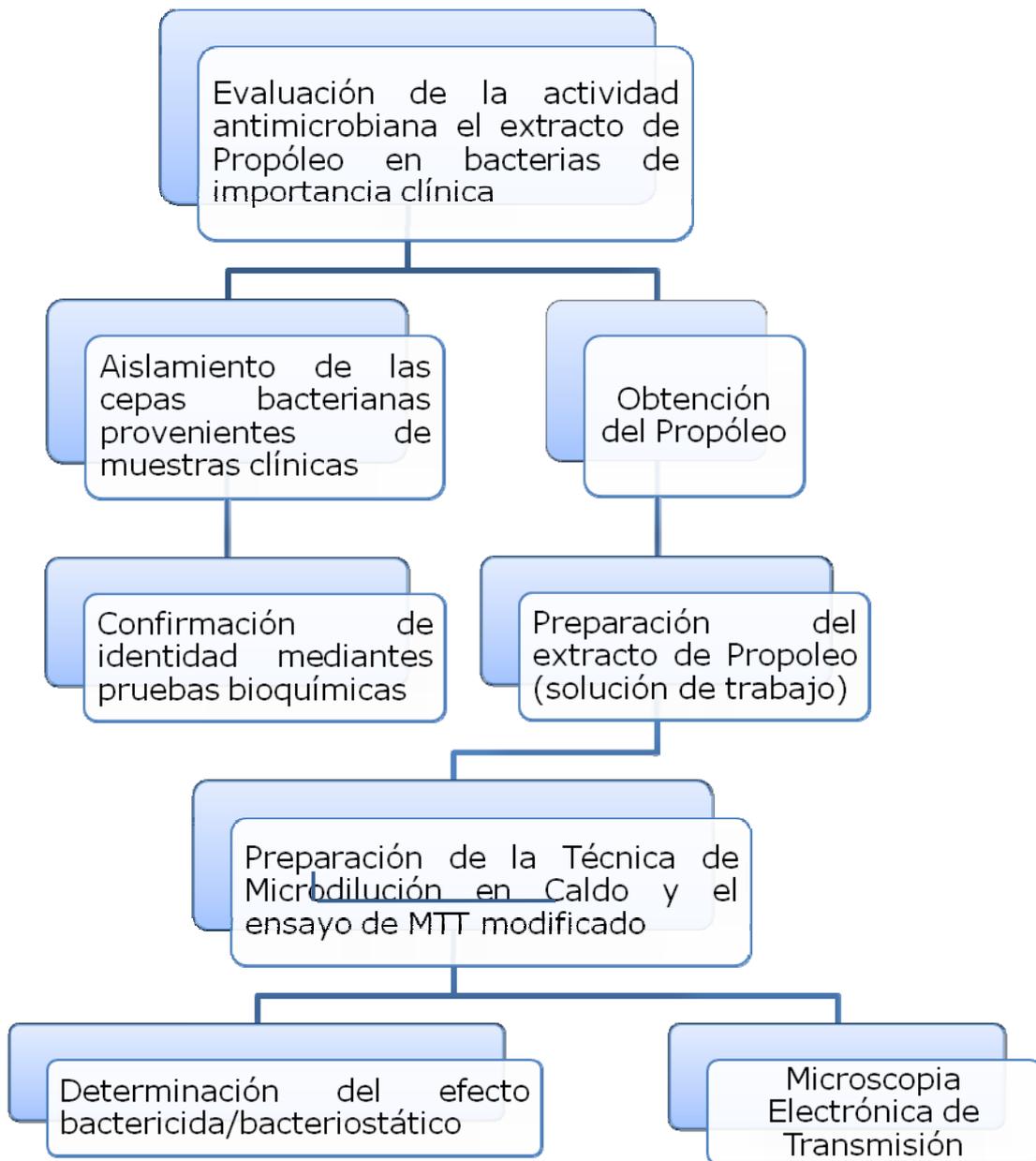
4.2 Objetivos Particulares

- ✓ Identificación de cepas bacterianas mediante pruebas bioquímicas.
- ✓ Preparación de la Solución de Trabajo (extracto de Propóleo).
- ✓ Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Bactericida (CMB), de cada una de las bacterias, por medio de la Técnica de Microdilución en Caldo y por el Ensayo del MTT modificado.
- ✓ Determinar el efecto bactericida y/o bacteriostático del extracto de Propóleo, en las bacterias, utilizadas en dicho estudio.
- ✓ Evidenciar los probables cambios estructurales producidos por el extracto de Propóleo, en las cepas bacterianas, por medio la Técnica de Tinción Negativa, y la observación en el Microscopio Electrónico de Transmisión.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Metodología

Figura 7.- Diagrama General de Trabajo



5.1.1 Elaboración del extracto de Propóleo

Disolver una muestra de 19 g de Propóleo en 2.4 L de etanol al 76% en un frasco ámbar protegido de la luz y a temperatura ambiente. Mantener en agitación constante durante 48 hrs, se uso una estufa olbital (New Brunswick Scientific, Serie 25) con temperatura de 21-24°C y 100 rpm (15).

Utilizar papel Whatman Núm. 3 para filtrar el extracto las veces que sean necesarias. En un filtro bala, acompañado de una bomba de vacío se esteriliza el extracto haciéndolo pasar por membranas Milipore de 0.8 μm , 0.45 μm , 0.2 μm . Se hace pasar nuevamente por una membrana Milipore de 0.2 μm y se recibe en un frasco ámbar oscuro estéril rotulado previamente.

Sumergir un hisopo estéril en el extracto y sembrar de manera masiva en una placa de agar MH, incubar y revisar las placas de 24 a 48 hrs. a 37°C para efectuar la prueba de esterilidad. Al observar la placa de agar MH no debe existir crecimiento alguno.

Contenido en un cristalizador estéril, el extracto es colocado en la estufa por 72 hrs. a 56°C. Una vez obtenida la materia sólida se colecta, etiqueta y pesa en un vial en condiciones de esterilidad (15).

Preparar la solución de trabajo (ST) de la siguiente manera: Pesar 1g de la materia sólida en un vial estéril, disolverla en 3 ml de DMSO y llevar a un aforo de 10 ml con glicerina estéril, homogenizar fuertemente la mezcla. La ST presenta una concentración de 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

A la ST se le realiza una prueba de esterilidad, en caso de presentar un agente contaminante se procede a esterilizar por filtración. La solución estéril se coloca y conserva en un frasco ámbar protegido de la luz y en refrigeración.

5.1.2 Ensayo en microplaca (preparación)

Para llevar a cabo esta técnica se necesita las bacterias aisladas, identificadas, purificadas y presentes en cultivos de agar MH de 24 hrs.

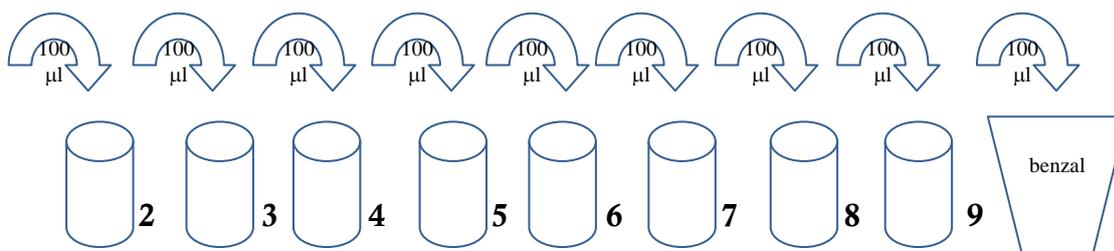
Preparar 10 ml de caldo MH a doble concentración, por cada una de las bacterias a utilizar en el ensayo. Por otra parte preparar 16 ml de Solución Salina Fisiológica (SSF) al 0.85%, colocar 8 ml en cada uno de los 2 tubos de ensaye grandes. Esterilizar todo lo anterior en autoclave a 15lb de presión y 121°C durante 15 minutos junto con puntas para micropipeta de 100 µl. Posteriormente inocular con la bacteria seleccionada los 10 ml del caldo MH a doble concentración y estandarizarla al 0.5 del nefelómetro de Mc Farland.

5.1.3.1 Ensayo en microplaca

En una microplaca estéril de 96 pozos se llevara a cabo el ensayo de las bacterias y la ST a distintas concentraciones, en una campana de flujo laminar. En un microplaca de 96 pozos, la cual posee: 12 columnas enumeradas del 1 al 12 y 8 filas que van de la letra A a la H, se colocan 100 µl de Solución Salina Fisiológica estéril de la columna número 2 a la 11 de la letra A a la H; Se adicionan 100 µl de extracto (ST) a la columna 1-2 y 12; Agregar de la columna 1 a la 10 (esta columna corresponde al control positivo), 100 µl de la bacteria en cuestión, estandarizada al 0.5 del nefelómetro de Mc Farland de la letra A a la H; Por último se adicionan 100 µl de caldo MH a doble concentración sin bacteria a la columna 11 y 12 de la letra A a la H, que son el control negativo y un blanco respectivamente. Una vez que los pozos están debidamente ocupados, se realizan diluciones dobles a partir de la columna 2 a la número 9 de la cual se desechan 100 µl en un frasco con benzal después de realizar la última dilución (para obtener un volumen final de 200 µl en los 96 pozos) de la letra A a la H; Incubar la microplaca en una estufa bacteriológica 24 hrs. a 37°C. Repetir el procedimiento anterior las veces necesarias para cubrir las bacterias en cuestión

Tabla 3.- Preparación del Ensayo en Microplaca.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10 Control +	11 Control -	12 Blanco
A	100 µl del extracto + 100 µl de la bacteria a probar 0.5 Mc Farland	Agregar 100 µl de SSF + 100 µl del extracto + 100 µl de la bacteria a probar 0.5 Mc Farland (Mezclar, tomar nuevamente 100 µl del mismo pozo, y colocarlo en el siguiente, y así sucesivamente), al tomar los 100 µl del pozo 9, desecharlos en un frasco con benzal, como se muestra a continuación								100 µl de SSF + 100 µl de la bacteria a probar 0.5 Mc Farland	100 µl de SSF + 100 µl de Caldo MH	100 µl del extracto + 100 µl de Caldo MH
B												
C												
D												
E												
F												
G												



5.1.3.2 Lectura e interpretación de resultados

Dicha microplaca, después de haberla sometido a una incubación previa de 24 hrs. a 37°C se realiza una lectura visual con parámetros de nitidez ó turbidez de cada uno de los pozos problema comparados con el control positivo, negativo y el blanco. El control negativo y el blanco deben presentar nitidez absoluta, es el caso contrario del control positivo el cual debe presentar turbidez.

Cuanto más semejante es la turbidez de los pozos problema (de la columna 2 a la 9 de la letra A a la H) al control positivo (columna 10 de la letra A a la H), es evidente el crecimiento de la bacteria; Los pozos que presentan nitidez deben ser comparados con el control negativo, cuando la semejanza entre ellos es más pronunciada, el efecto del extracto (ST) es satisfactorio, ya que inhibe el crecimiento de la bacteria.

Posteriormente se realiza una lectura colorimétrica con la adición de 5 µl de reactivo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5 difeniltetrazol (MTT) a cada pozo, el cual presenta una coloración amarilla, se incuba la microplaca nuevamente en una estufa bacteriológica de 3-4 hrs. a 37°C, la presencia de bacterias viables y su crecimiento en alguno de los pozos mencionados es evidenciada por una coloración violeta/morado debida al vire del reactivo de MTT, cuando el color amarillo permanece, la ausencia de bacterias viables es la razón. El reactivo de MTT se utilizó debido a que el anillo de tetrazol es roto principalmente por mitocondrias activas y, se piensa que otras regiones extracelulares con actividad succinato deshidrogenasa y pueden contribuir a la producción del formazan total. Por lo tanto la reacción ocurre solo en células vivas (4).

Una vez que se observó la coloración se hace una lectura espectrofotométricamente a 595 nm de longitud de onda.

Esta técnica permite observar de manera fácil que pozos de la microplaca presentan crecimiento y cuales son inhibidos por el extracto (ST), lo que permite determinar la CMI.

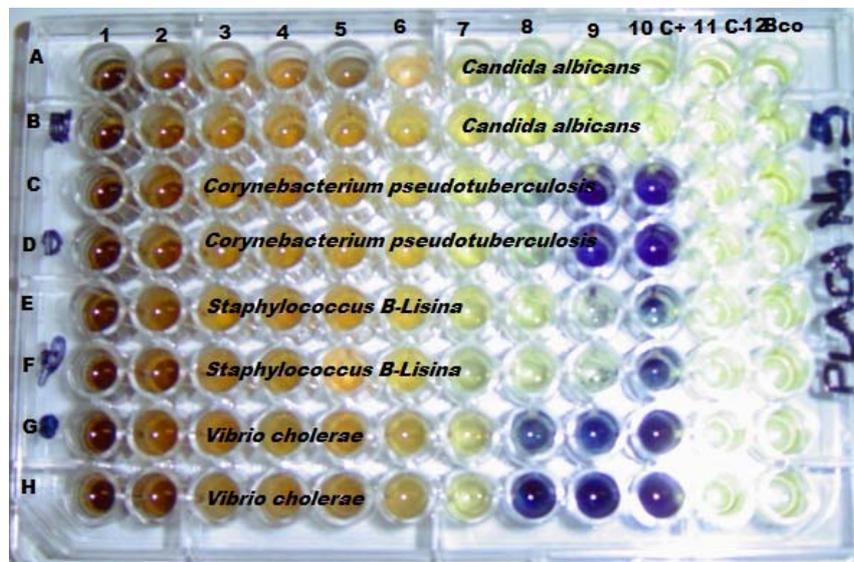


Figura 8.- Microplaca con diluciones de extracto de Propóleo a evaluar, evidenciando la actividad bacteriana con el reactivo de MTT.

5.1.3.3 Determinación de la Concentración Mínima Bactericida (CMB)

La concentración Mínima Bactericida (CMB), se define como la mínima concentración del extracto que elimina a más del 99.9% de los microorganismos viables después de un tiempo determinado, lo cual es evidenciado mediante el crecimiento o no de las 12 estrías realizadas en la placa de agar MH, que representan tanto los pozos problema, control positivo, control negativo y el blanco.

5.1.3.4 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), es la mínima concentración del extracto (ST) que inhibe el crecimiento, multiplicación, producción y viabilidad de una cepa bacteriana, lo cual es evidenciado mediante turbidez ó nitidez y colorimetría.

5.1.3.5 Determinación del efecto bactericida y/o bacteriostático

Preparar una caja de agar MH por cada bacteria ensayada, en la base de la misma hacer 12 divisiones iguales mediante líneas y enumerarlas del uno al doce con el objetivo de representar los doce pozos incluyendo el control positivo, negativo y el blanco (de la columna 1 a la 12 de la fila en cuestión, que puede ser de la letra A a la H) los cuales deben contener a la misma bacteria, la(s) fila(s) utilizada(s) para designar a la(s) bacteria(s) debe ser seleccionada de acuerdo a los intereses y comodidades del usuario).

Una vez realizada la lectura visual de nitidez ó turbidez y antes de que se agregué el reactivo MTT para llevar a cabo la lectura del ensayo en la microplaca de forma colorimétrica, en condiciones de esterilidad sembrar una estría por cada uno de los doce pozos con una asa estéril (de la columna 1 a la 12 de la fila en cuestión, que puede ser de letra A a la H) en la placa de agar MH, previamente dividida y rotulada con la bacteria y fila ensayada, una vez sembradas todas las bacterias en cuestión se incuban en una estufa bacteriológica a 37°C durante 24 hrs.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación verificar que los controles negativos no presenten crecimiento, debe ser el caso contrario de los controles positivos. Si existe crecimiento en donde se sembró la muestra problema se determina que el efecto es bacteriostático. En el caso contrario el efecto es bactericida.

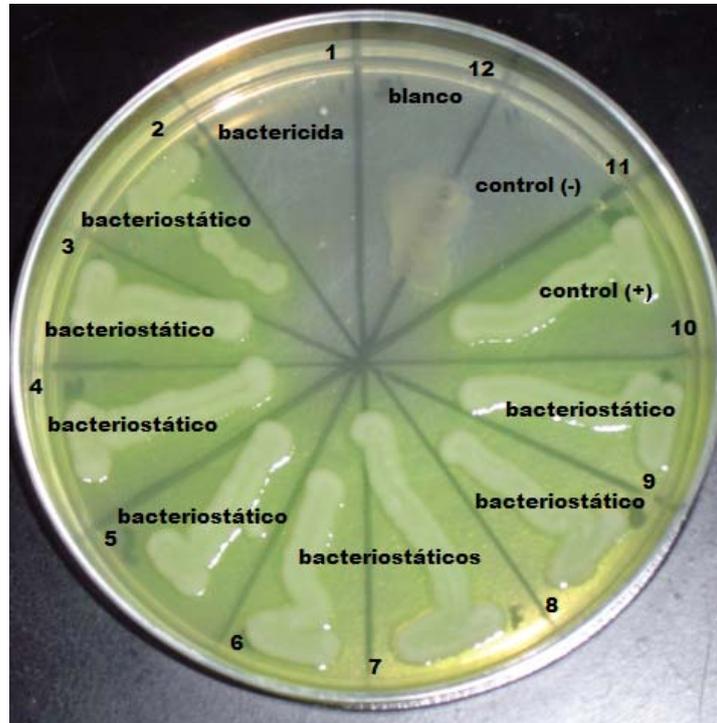


Figura 9.- Determinación del efecto bactericida y/o bacteriostático en la bacteria *Pseudomonas fluorescens*.

5.1.3 Microscopia Electrónica de Transmisión

Sembrar las bacterias (seleccionadas previamente de acuerdo a su sensibilidad y resistencia al extracto), *Streptococcus* del Grupo D, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi* en cajas de agar MH, incubar las bacterias 24 hrs. a 37°C en una estufa bacteriológica.

Preparar 15ml de Solución Salina Fisiológica al 0.85% y caldo MH a doble concentración, distribuir 2.5ml del caldo MH en 6 tubos de ensaye de 13 x 100mm y 10 pipetas graduadas de 5ml, esterilizar en autoclave.

Estandarizar cada una de las tres bacterias con crecimiento previo de 24 hrs. en 2 de los 6 tubos con caldo MH a doble concentración estéril (la misma bacteria en dos tubos, rotular uno como control y el otro como problema por cada bacteria) a 0.5 del Nefelómetro de Mc Farland.

Agregar a los tres tubos control 2.5ml de Solución salina fisiológica estéril y a los tres tubos problema 2.5ml del extracto de Propóleo con las pipetas estériles. Incubar los 6 tubos a 37°C durante 18-24hrs en una estufa bacteriológica. Una vez transcurrido el tiempo, centrifugar a 2500 rpm durante 15 minutos, desechar el sobrenadante y resuspender la pastilla en 2.5 ml de Solución Salina Fisiológica estéril (esto se realiza 2 veces). Se centrifuga nuevamente, se desecha el sobrenadante y se agrega 3 ml del reactivo de Karnosky, se deja reposar por 1hr. Se realiza una última centrifugación a 2500 rpm pero esta vez 30 minutos, se elimina el sobrenadante y la pastilla se resuspender en 3ml de Solución Buffer de Fosfatos.

5.1.3.1 Preparación de las rejillas con membrana FOMVAR

Las rejillas deben ser lavadas con acetona y estar secas completamente. Preparar una solución Fomvar al 0.1 % con cloroformo, si se hacen con parlodión, se prepara una solución con 0.1 % de paladión en acetato de amilo. Llenar un vaso de precipitados con capacidad de 1 L previamente limpio, con agua destilada, colocar una lámpara para que ilumine la superficie del agua. Impregnar un portaobjetos con Fomvar y dejar reposar hasta que seque la película, después con ayuda de unas pinzas se cortan las cuatro orillas del portaobjetos y sobre el agua destilada se sumerge poco a poco, hasta separar la película plástica que debe tener un color dorado plateado. Colocar las rejillas sobre la membrana y posteriormente se recogen con papel filtro. Las rejillas se deben secar perfectamente antes de volverse a usar.

5.1.3.2 Técnica de tinción negativa

Depositar una gota de suspensión bacteriana sobre un papel parafilm, se colocan dos rejillas con membrana para que se adsorba la muestra durante un tiempo que varía entre 5 y 30 minutos.

Se toman las rejillas y el exceso se absorbe con papel filtro y enseguida son teñidos con una gota de ácido fosfotúngstico (AFT solución al 1% con pH=7.2) durante un periodo que varía entre 5 y 30 minutos.

Las rejillas son recogidas y se absorbe el exceso de colorante y son secadas a temperatura ambiente o en estufa a 35°C.

Las muestras son observadas y fotografiadas en el Microscopio Electrónico de Transmisión (JEOL JEM 100 S).

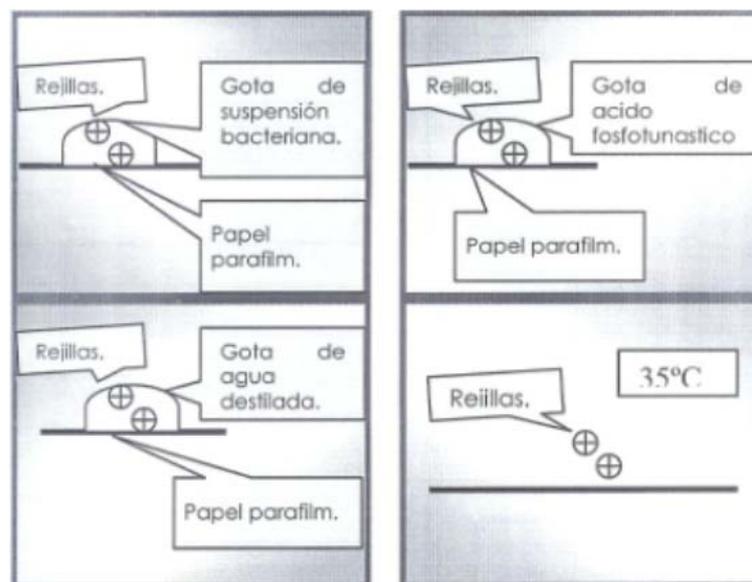


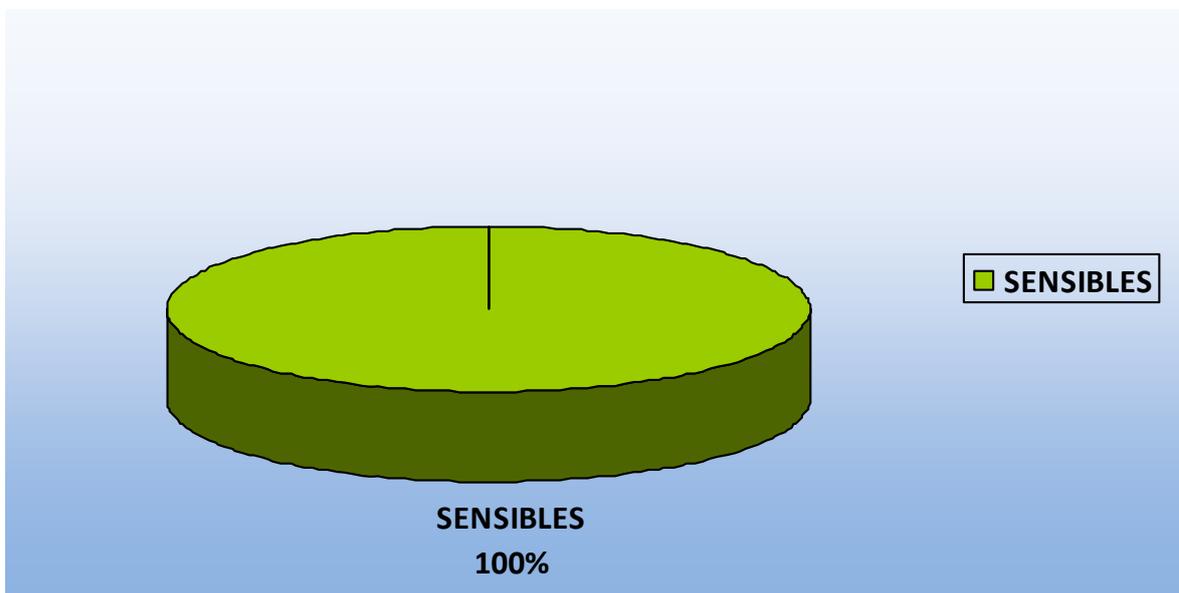
Figura 10.- Técnica de Tinción Negativa (44).

6. RESULTADOS

6.1 Evaluación del efecto inhibitorio del extracto de Propóleo

De las 20 cepas ensayadas el (100%) demostraron ser sensibles (**S**) a la actividad del Propóleo en alguna de las concentraciones ensayadas.

Gráfica 1.- Comparativo de las 20 cepas probadas y ensayadas con extracto de Propóleo.



6.1.1 Comportamiento de las cepas bacterianas y *Candida albicans* (levadura), frente al extracto de Propóleo.

Tabla 4.- Comportamiento de las cepas bacterianas y *Candida albicans* (levadura), con el extracto de Propóleo. **S** (sensible), **R** (resistente).

Bacterias Gram (+) y <i>Candida albicans</i> (levadura)		Bacterias Gram (-)	
1.	<i>Candida albicans</i> (levadura) (S)	11.	<i>Enterobacter aerogenes</i> (S)
2.	<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> (S)	12.	<i>Enterobacter cloacae</i> (S)
3.	<i>Enterococcus</i> (S)	13.	<i>Escherichia coli</i> (S)
4.	<i>Listeria monocytogenes</i> (S)	14.	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (S)
5.	<i>Staphylococcus aureus</i> (S)	15.	<i>Pasteurella multocida</i> (S)
6.	<i>Staphylococcus B-Lisina</i> (S)	16.	<i>Proteus mirabilis</i> (S)
7.	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (S)	17.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (S)
8.	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> (S)	18.	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (S)
9.	<i>Streptococcus agalactiae</i> (S)	19.	<i>Salmonella typhi</i> (S)
10.	<i>Streptococcus pyogenes</i> (S)	20.	<i>Vibrio cholerae</i> (S)

6.1.2 Susceptibilidad, de las cepas bacterianas y *Candida albicans* (levadura) a las diferentes concentraciones del extracto.

Tabla 5.- Diferencias encontradas en la susceptibilidad, de las cepas bacterianas y *Candida albicans* (levadura), a las diferentes concentraciones del extracto de Propóleo.

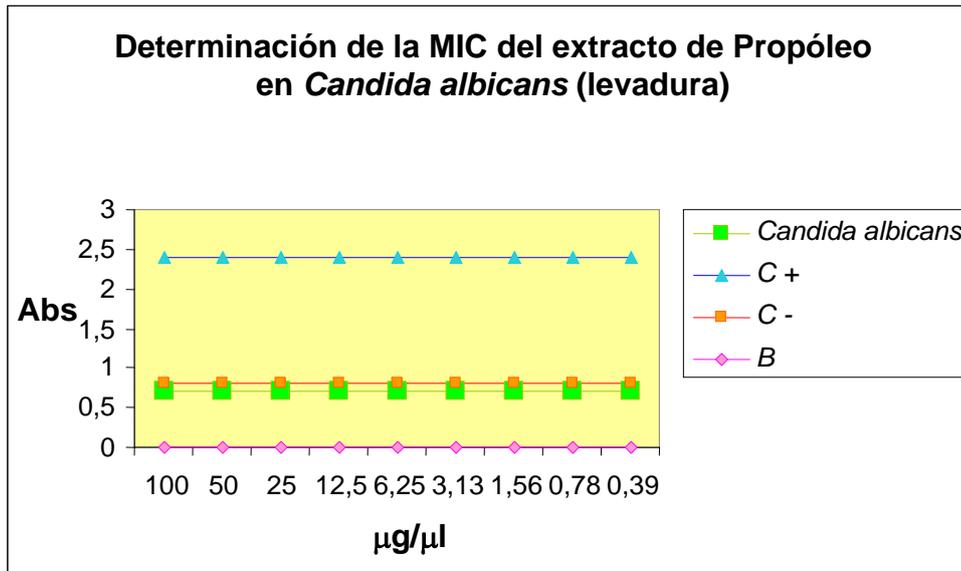
Cepa bacteriana y <i>Candida albicans</i> (levadura)	100,000 µg/µl	50,000 µg/µl	25,000 µg/µl	12,500 µg/µl	6,250 µg/µl	3,125 µg/µl	1.560 µg/µl	781.25 µg/µl	390.63 µg/µl
1. <i>Candida albicans</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
2. <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	R
3. <i>Streptococcus del Grupo D</i>	S	S	S	S	S	S	R	R	R

4. <i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	S	R	R	R	R	R	R
5. <i>Staphylococcus B-Lisina</i>	S	S	S	S	S	S	S	R	R
6. <i>Staphylococcus epidermidis</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
7. <i>Staphylococcus saprophyticus</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
8. <i>Streptococcus agalactiae</i>	S	S	S	S	R	R	R	R	R
9. <i>Streptococcus pyogenes</i>	S	S	S	S	S	S	S	R	R
10. <i>Enterobacter aerogenes</i>	S	S	S	R	R	R	R	R	R
11. <i>Enterobacter cloacae</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	R
12. <i>Escherichia coli</i>	S	S	S	S	R	R	R	R	R
13. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	S	S	S	S	S	R	R	R	R
14. <i>Listeria monocytogenes</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	R
15. <i>Pasteurella multocida</i>	S	S	S	S	S	R	R	R	R
16. <i>Proteus mirabilis</i>	S	S	S	S	S	R	R	R	R
17. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	R
18. <i>Pseudomonas fluorescens</i>	S	S	R	R	R	R	R	R	R
19. <i>Salmonella typhi</i>	S	S	S	R	R	R	R	R	R
20. <i>Vibrio cholerae</i>	S	S	S	S	S	S	S	R	R

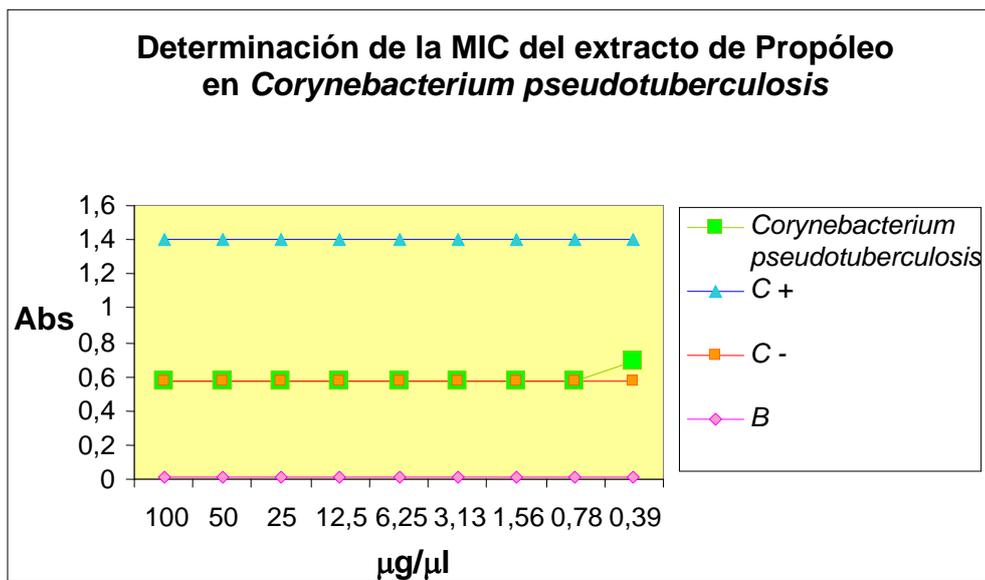
S (Sensible); R (Resistente)

6.1.3 Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de cada una de las cepas bacterianas y *Candida albicans* (levadura).

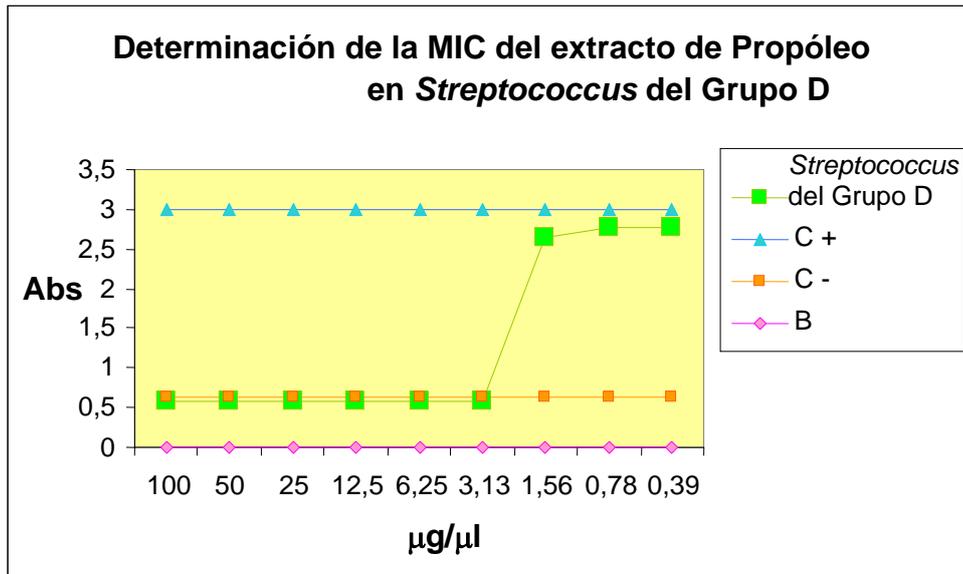
Gráfica 2. Determinación de la MIC en *Candida albicans* (levadura).



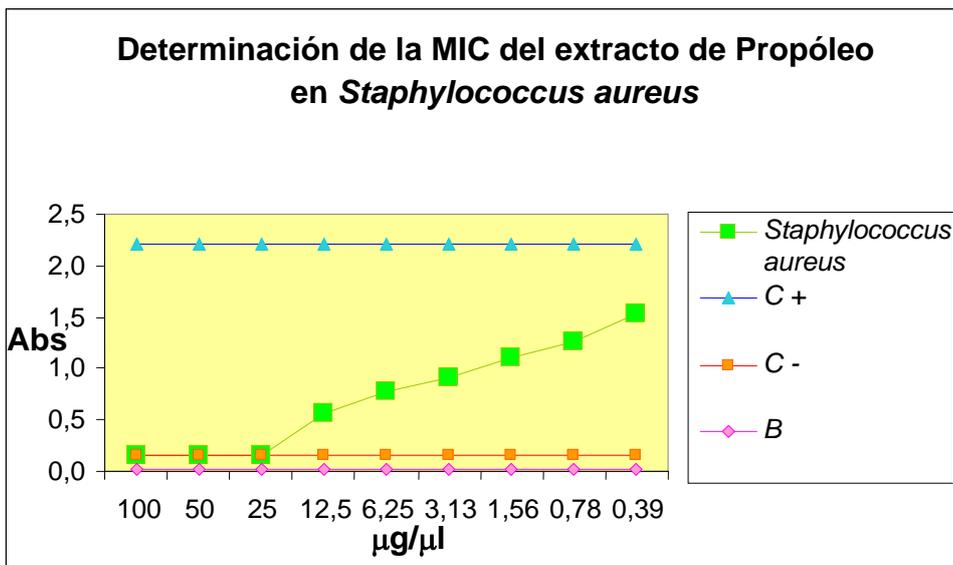
Gráfica 3. Determinación de la MIC en *Corynebacterium pseudotuberculosis*



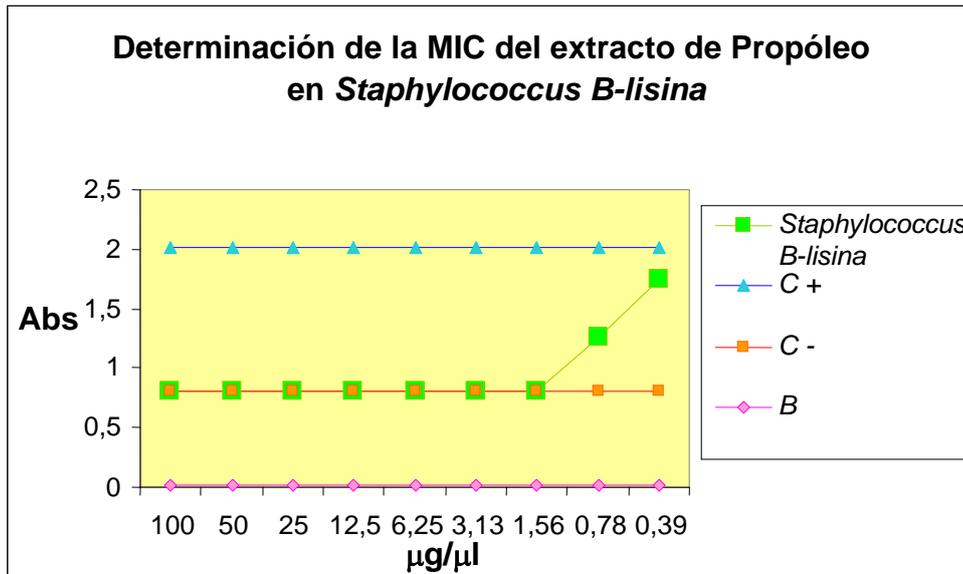
Gráfica 4. Determinación de la MIC en *Streptococcus* del Grupo D



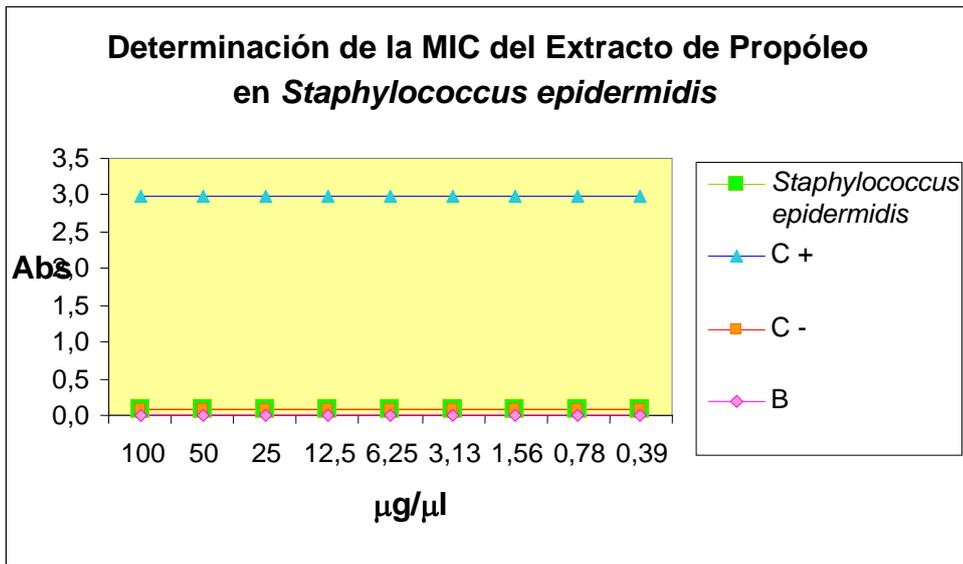
Gráfica 5. Determinación de la MIC en *Staphylococcus aureus*



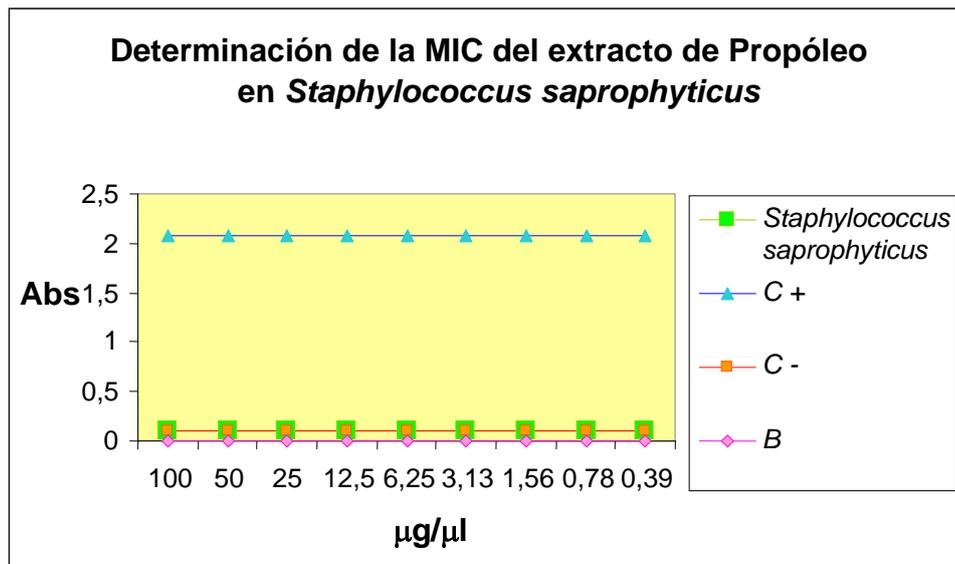
Gráfica 6. Determinación de la MIC en *Staphylococcus B-lisina*



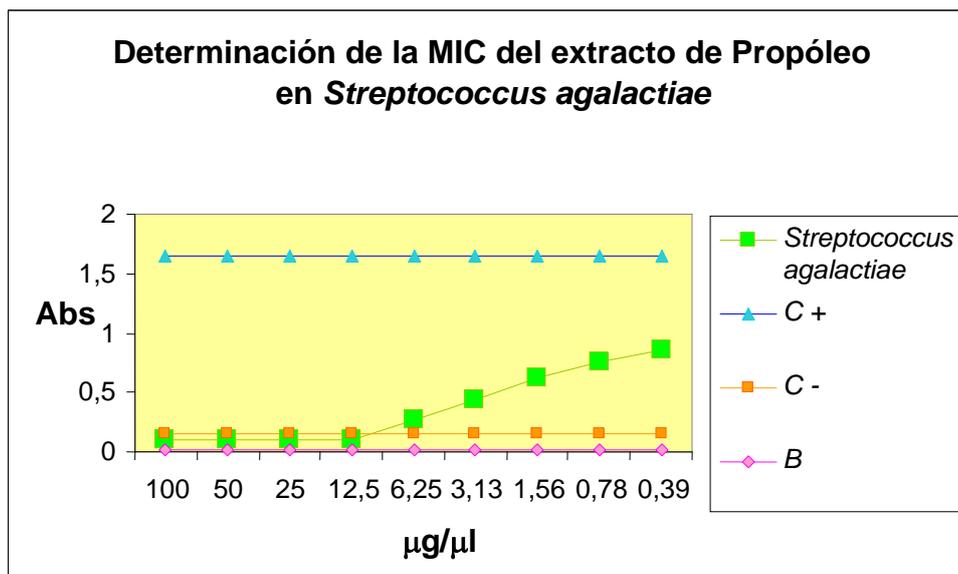
Gráfica 7. Determinación de la MIC en *Staphylococcus epidermidis*



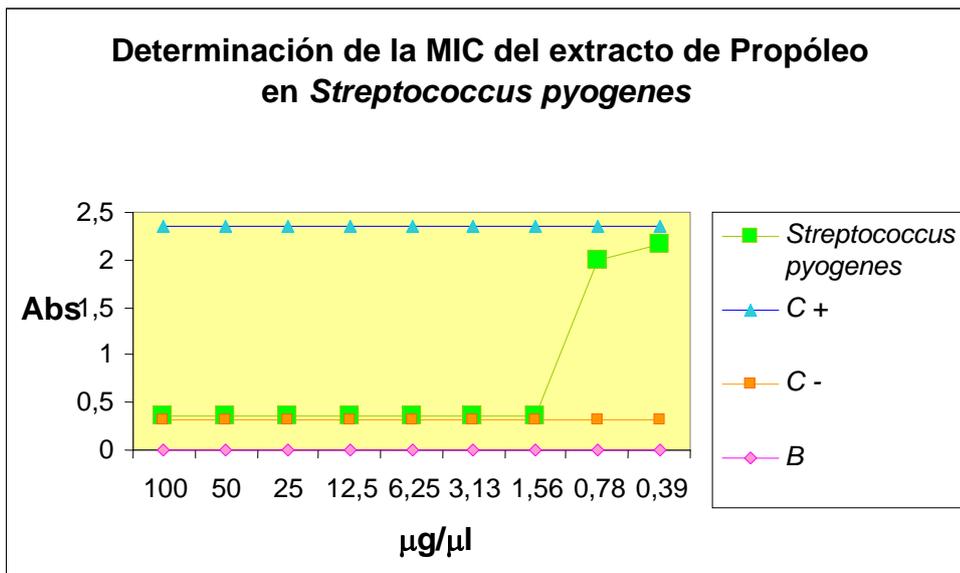
Gráfica 8. Determinación de la MIC en *Staphylococcus saprophyticus*



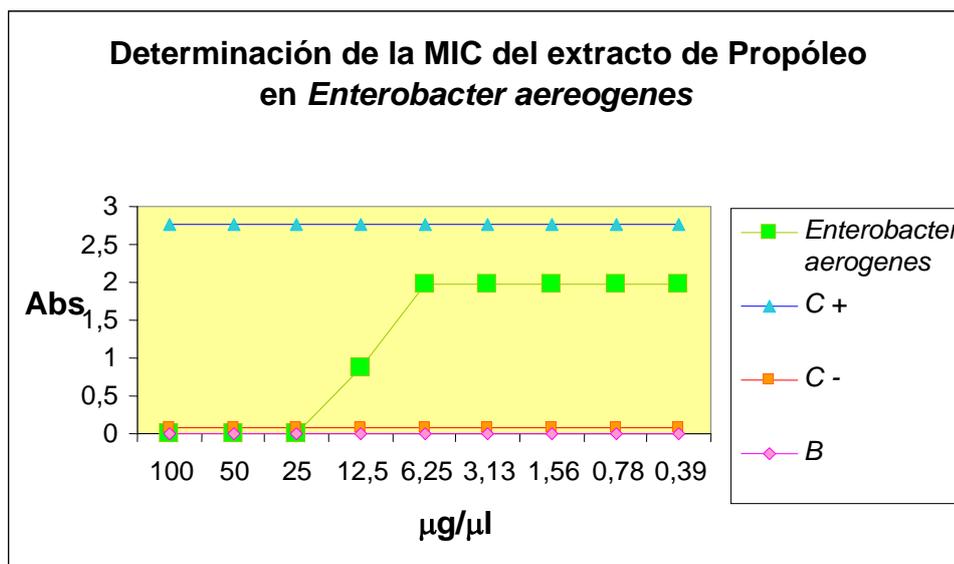
Gráfica 9. Determinación de la MIC en *Streptococcus agalactiae*



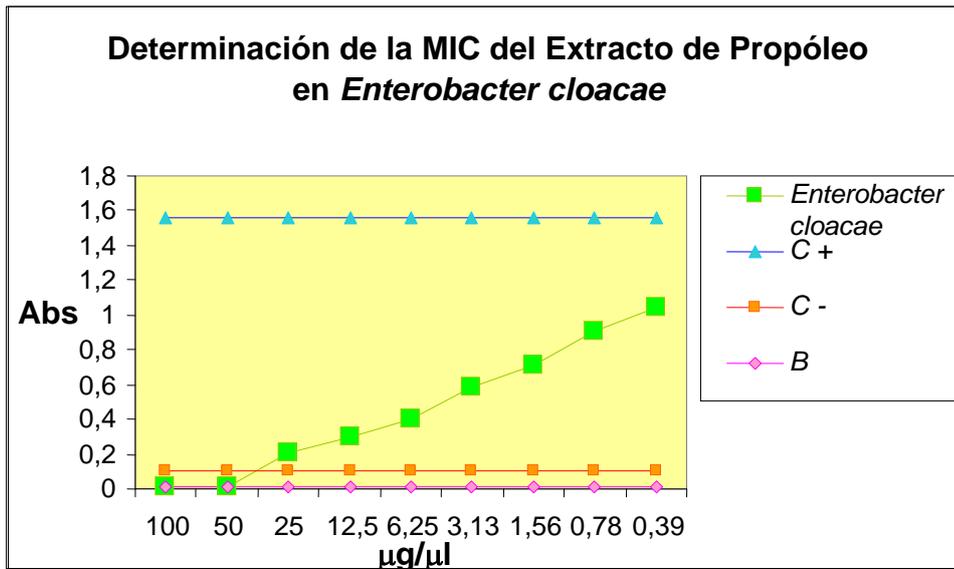
Gráfica 10. Determinación de la MIC en *Streptococcus pyogenes*



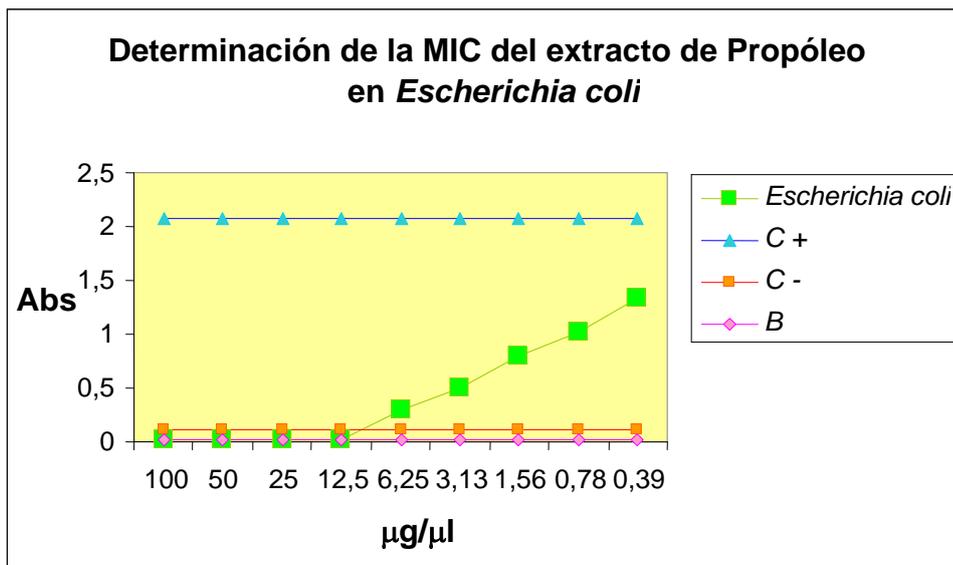
Gráfica 11. Determinación de la MIC en *Enterobacter aerogenes*



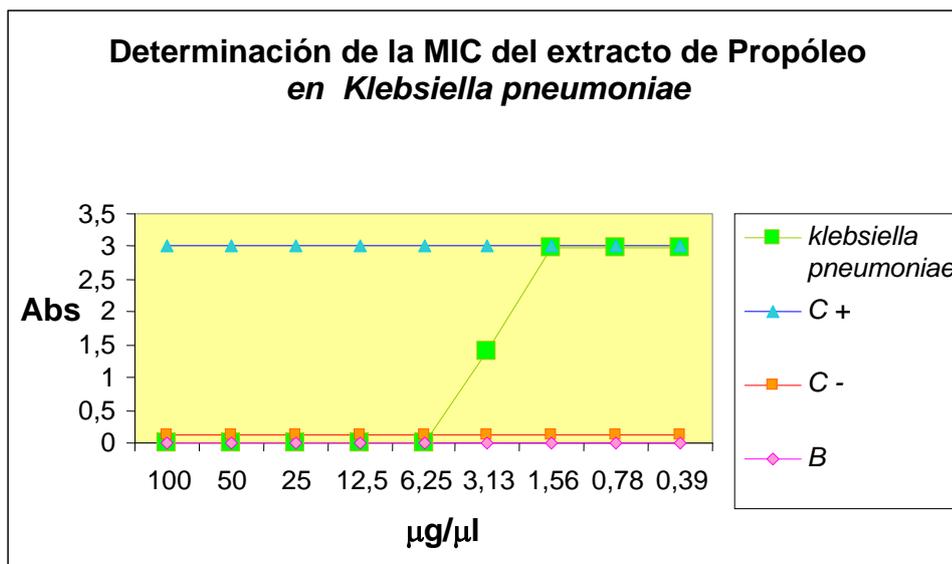
Gráfica 12. Determinación de la MIC en *Enterobacter cloacae*



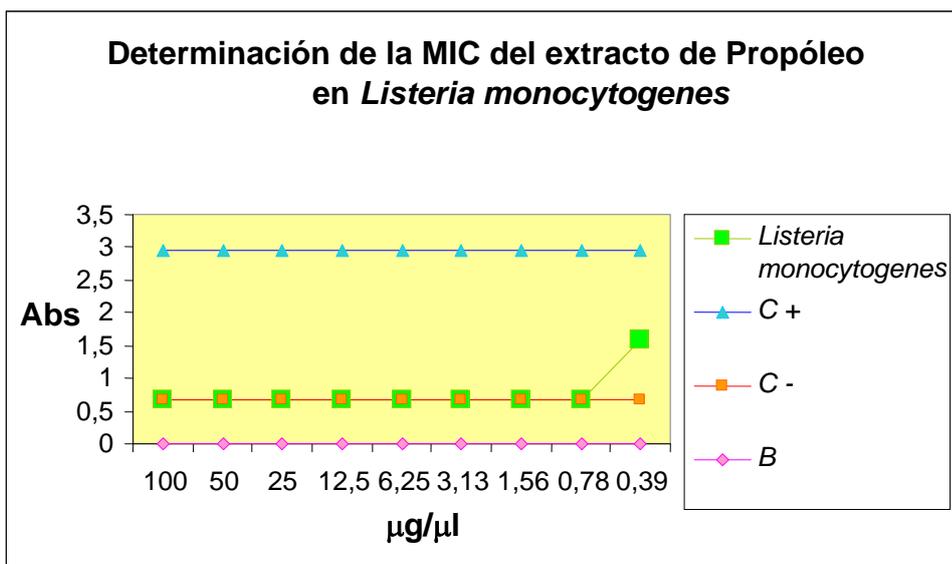
Gráfica 13. Determinación de la MIC en *Escherichia coli*



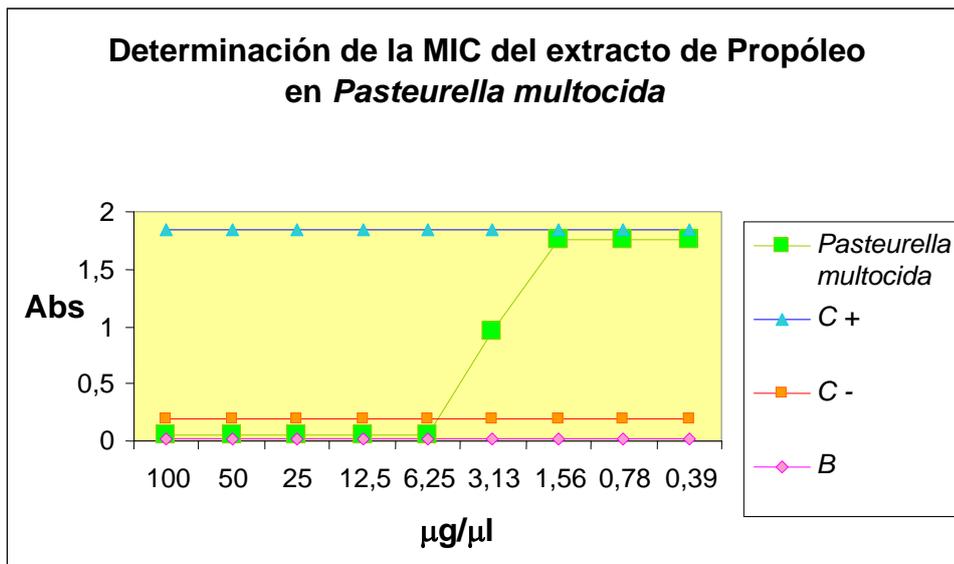
Gráfica 14. Determinación de la MIC en *Klebsiella pneumoniae*



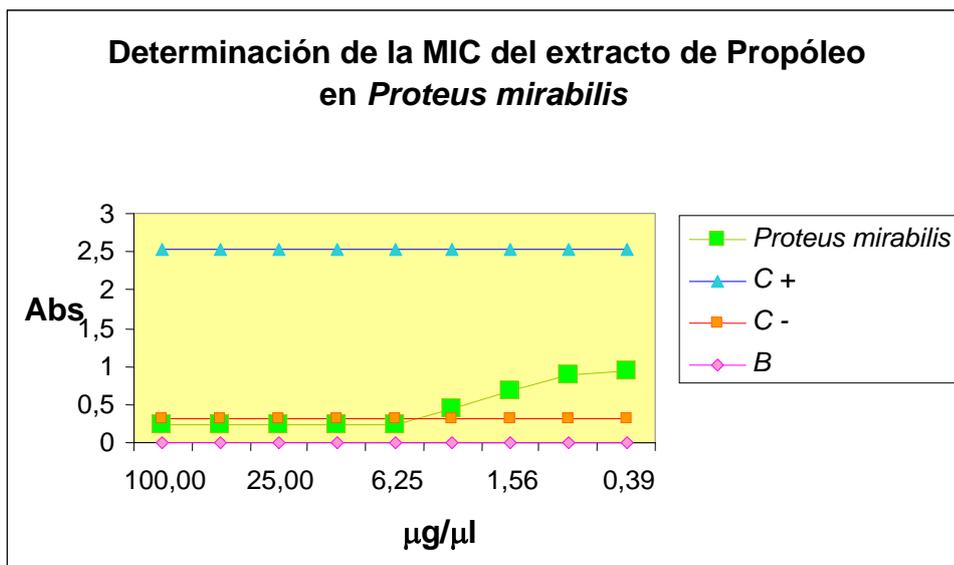
Gráfica 15. Determinación de la MIC en *Listeria monocytogenes*



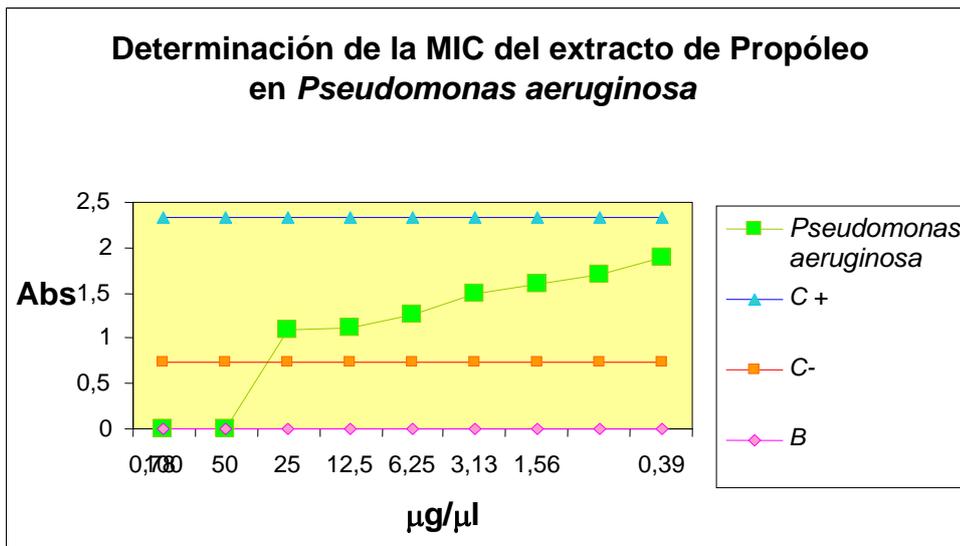
Gráfica 16. Determinación de la MIC en *Pasteurella multocida*



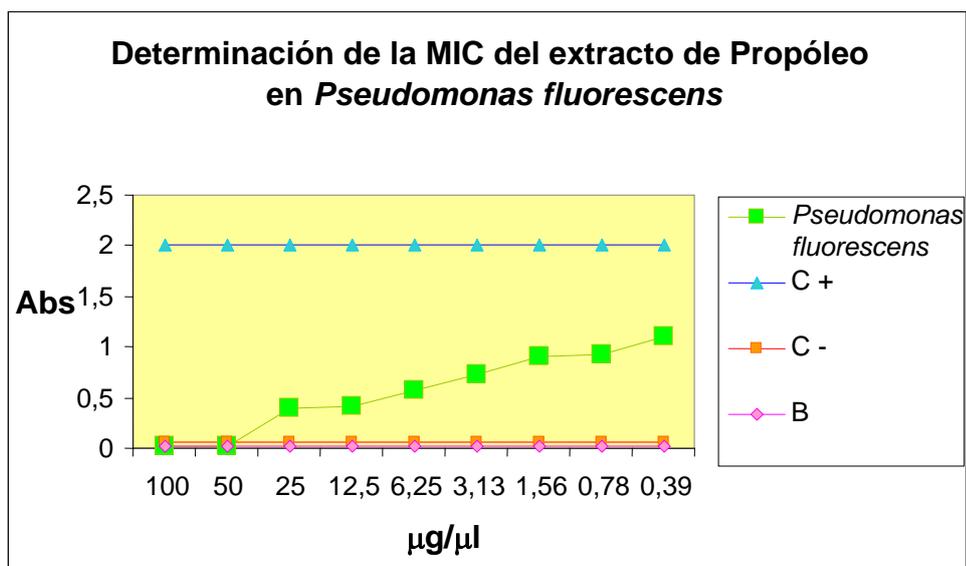
Gráfica 17. Determinación de la MIC en *Proteus mirabilis*



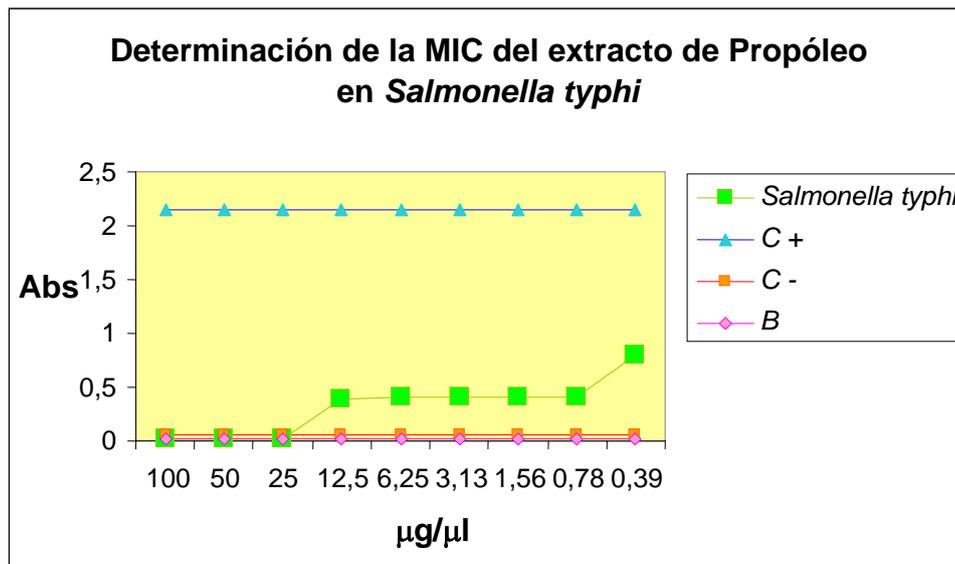
Gráfica 18. Determinación de la MIC en *Pseudomonas aeruginosa*



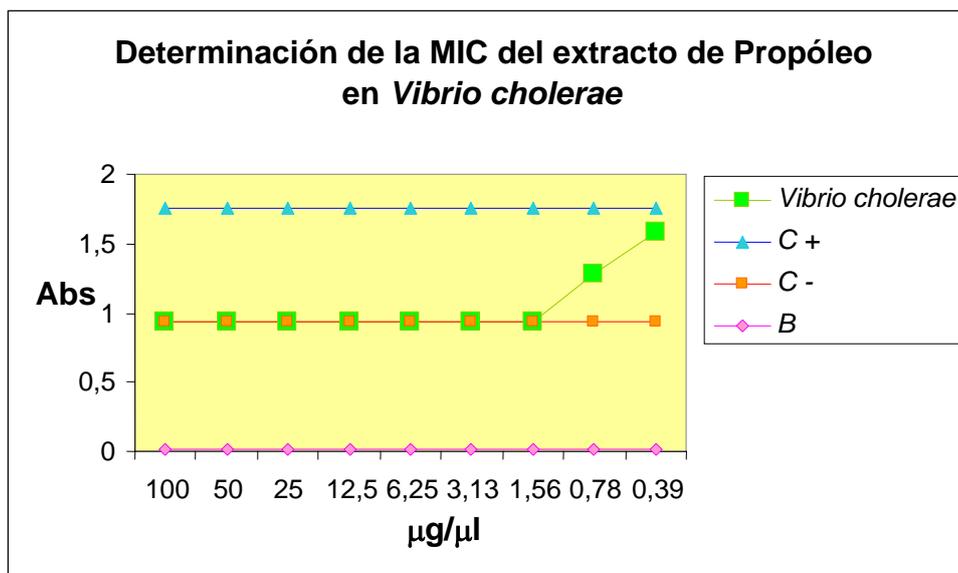
Gráfica 19. Determinación de la MIC en *Pseudomonas fluorescens*



Gráfica 20. Determinación de la MIC en *Salmonella typhi*



Gráfica 21. Determinación de la MIC en *Vibrio cholerae*



6.2 Efecto bactericida y/o bacteriostático

6.2.1 Determinación de la CMB y/o CMI, en las cepas bacterianas y *Candida albicans* (levadura).

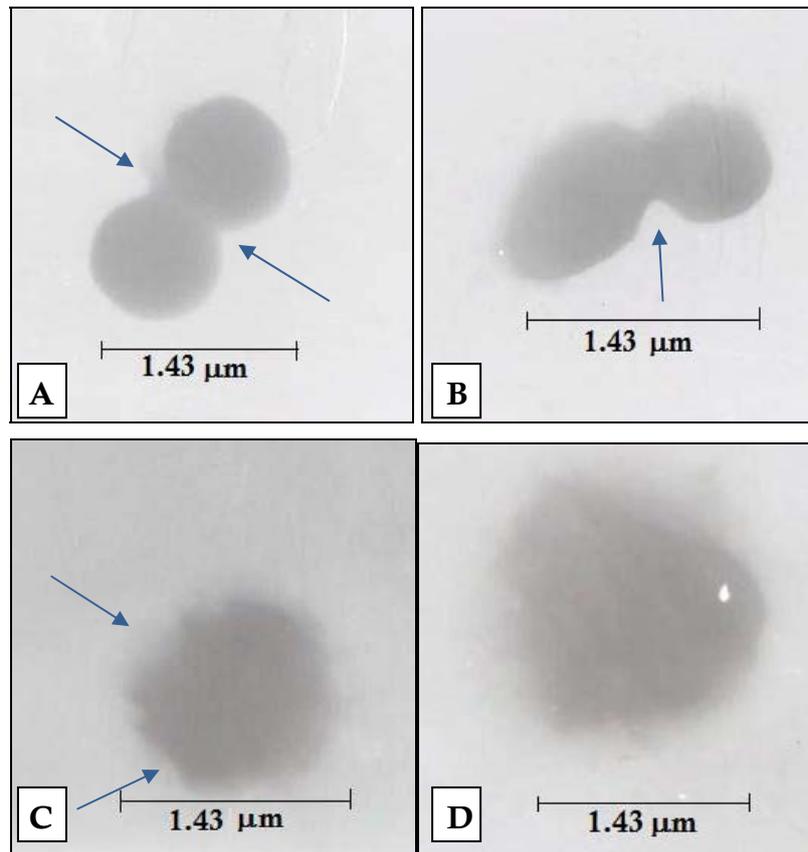
Tabla 6.- Resultados de la Concentración Mínima Bactericida (CMB) y/o de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del extracto de Propóleo.

Cepa Bacteriana	CMI ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	CMB ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Efecto
<i>Candida albicans</i> (levadura)	0.39		Bacteriostático
<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	0.78		Bacteriostático
<i>Streptococcus</i> del Grupo D	3.13	3.13	Bactericida
<i>Staphylococcus aureus</i>	25.0		Bacteriostático
<i>Staphylococcus aureus B-Lisina</i>	1.56	1.56	Bactericida
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0.39		Bacteriostático
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	0.39		Bacteriostático
<i>Streptococcus agalactiae</i>	12.5		Bacteriostático
<i>Streptococcus pyogenes</i>	1.56	1.56	Bactericida
<i>Enterobacter aerogenes</i>	25.0		Bacteriostático
<i>Enterobacter cloacae</i>	50.0	50.0	Bactericida
<i>Escherichia coli</i>	12.5		Bacteriostático
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	6.25		Bacteriostático
<i>Listeria monocytogenes</i>	0.78	0.78	Bactericida
<i>Pasteurella multocida</i>	6.25		Bacteriostático
<i>Proteus mirabilis</i>	6.25		Bacteriostático
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	50.0	50.0	Bactericida
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	50.0		Bacteriostático
<i>Salmonella typhi</i>	25.0		Bacteriostático
<i>Vibrio cholerae</i>	1.56	1.56	Bactericida

6.3 Observaciones obtenidas en el Microscopio Electrónico de Transmisión.

6.3.1 *Streptococcus* del Grupo D, tratado con el extracto de Propóleo

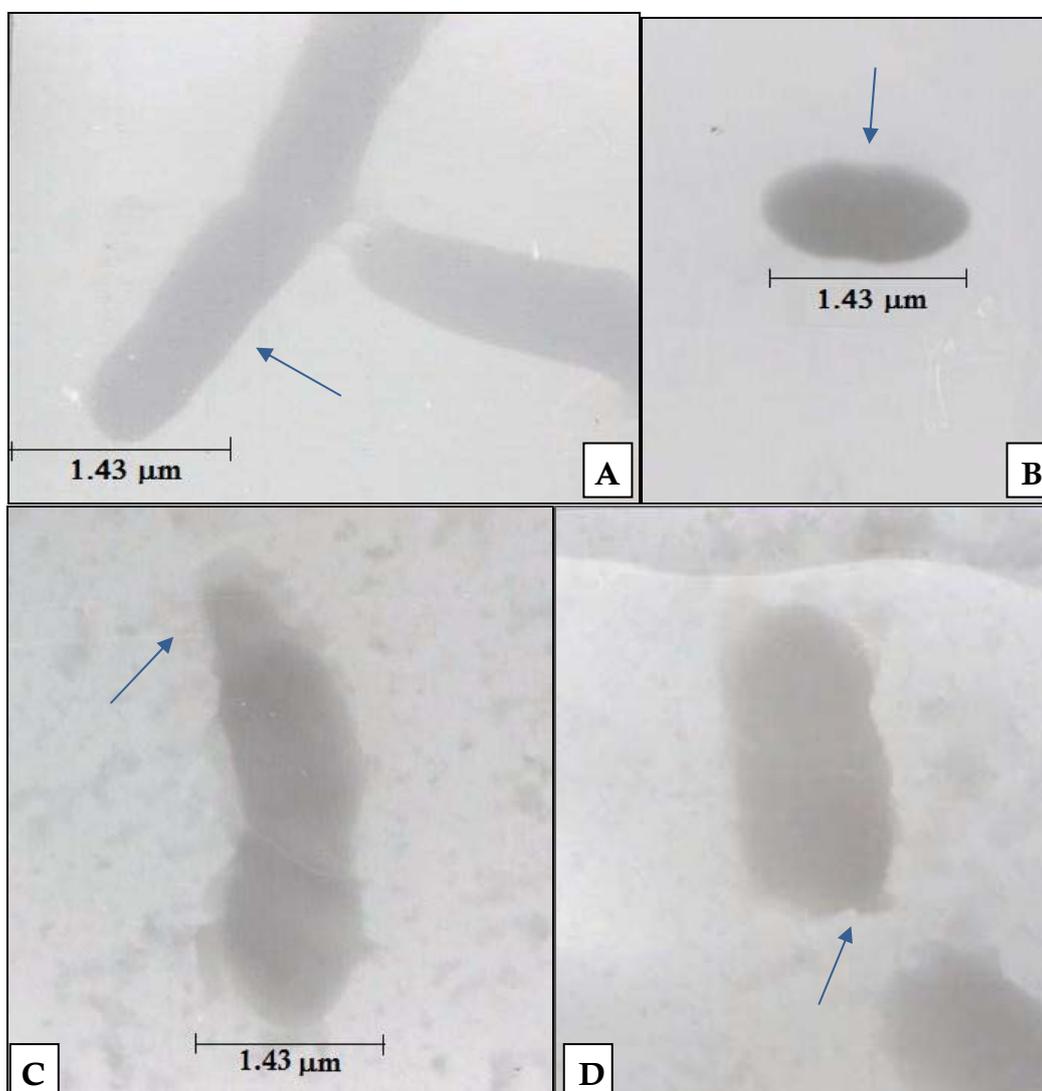
Figura 11.- Microfotografías de *Streptococcus* del grupo D: control (+) y tratados con el extracto de Propóleo, obtenidas del Microscopio Electrónico de Transmisión.



Microfotografía Electrónica de Transmisión de *Streptococcus* del grupo D, control (+) a 10000 magnificaciones, Tinción Negativa. **[A]** Nótese claramente la división celular de la bacteria así como su tendencia a formar pares y posteriormente cadenas, la superficie bacteriana es totalmente homogénea, sin protuberancias ni deformaciones. **[B]** División celular, generando las formas clásicas esféricas y lanceoladas de los *Streptococcus*. Microfotografía de *Streptococcus* grupo D, tratados con el extracto de Propóleo. **[C]** La imagen muestra una posible lisis de la bacteria. **[D]** Es notorio que el tamaño de la bacteria es mayor, posiblemente por los efectos que causa el extracto de Propóleo en la pared celular.

6.3.2 *Salmonella typhi*, tratada con el extracto de Propóleo

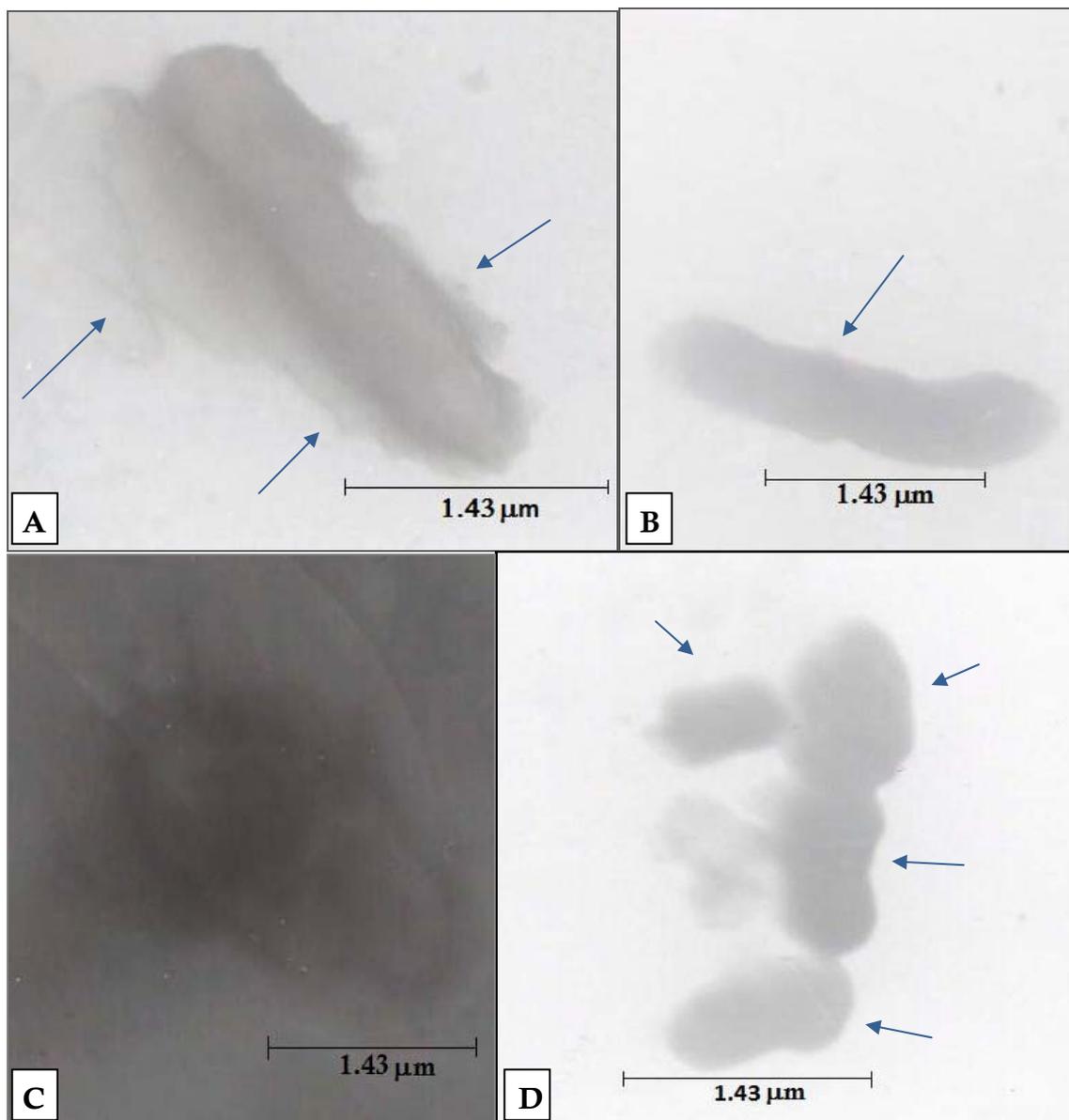
Figura 12.- Microfotografías de *Salmonella typhi*: control (+) y tratadas con el extracto de Propóleo, obtenidas del Microscopio Electrónico de Transmisión.



Microfotografía Electrónica de Transmisión de una colonia de *Salmonella typhi*, control (+) a 10000 magnificaciones, Tinción Negativa. **[A]** la superficie bacteriana es totalmente homogénea, sin protuberancias ni deformaciones. **[B]** División celular, generando las formas clásicas bacilares. Microfotografía de *Salmonella typhi* tratada con el extracto de Propóleo. **[C]** Nótese claramente la deformación del bacilo en el extremo superior, con salida de citosol por lisis. **[D]** Obsérvese la alteración de la pared celular en toda la extensión de la bacteria y en la parte inferior una protuberancia que probablemente sea un esferoplasto.

6.3.3 *Klebsiella pneumoniae*, tratada con el extracto de Propóleo.

Figura 13.- Microfotografías de *Klebsiella pneumoniae*: control (+) y tratadas con el extracto de Propóleo, obtenidas del Microscopio Electrónico de Transmisión.



Microfotografía Electrónica de Transmisión de *Klebsiella pneumoniae*, control (+) a 10000 magnificaciones, Tinción Negativa. **[A]** Se puede observar la forma bacilar, los flagelos, así como la presencia de la cápsula prominente la cual le confiere un aspecto mucoso, característicos de *Klebsiella pneumoniae*. **[B]** Nuevamente se observa la forma típica bacilar y algunos flagelos característicos de dicha bacteria. **[C]** Nótese el incremento en el tamaño de la bacteria, así como la forma atípica que presenta. **[D]** Se pueden observar algunas bacterias con formas atípicas y el tamaño disminuido.

7. DISCUSIÓN

En el presente trabajo evaluamos la actividad del Propóleo en 20 cepas bacterianas incluyendo a la levadura *Candida albicans*, demostrando que 100% de estas fueron 0sensibles a la actividad del Propóleo (**Gráfica 1**). Dichas cepas pertenecen al laboratorio 10 de Microbiología Experimental de la Unidad de Posgrado Campo 1 y el Propóleo proviene de los apicultores de Campo 4, ambos proporcionados por la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán-UNAM.

El efecto inhibitorio del Propóleo, mostro que los mejores resultados corresponden a *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus epidermidis* y *Candida albicans* (levadura) de acuerdo a la sensibilidad que presentan al extracto ya que no existe crecimiento de las mismas en ninguno de los pozos problemas, siendo la CMI de 0.39 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi* y *Enterobacter aerogenes* presentan una CMI de 25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, en tanto que *Streptococcus agalactiae* y *Escherichia coli* presentan una Concentración Mínima Inhibitoria de 12.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 6.25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ corresponden a *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pasteurella multocida*, 3.13 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a *Streptococcus* del Grupo D, 1.56 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ para *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus B-Lisina* y *Vibrio cholerae*, 0.78 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ para *Listeria monocytogenes* y *Corynebacterium pseudotuberculosis*. *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, y *Enterobacter cloacae* son más resistentes ya que fueron inhibidas en el segundo pozo problema, en donde el extracto se encuentra en una concentración de 50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

El extracto etanólico de Propóleo exhibe una mayor inhibición en el crecimiento de bacterias Gram positivas, mostrando una actividad pronunciada contra *Staphylococcus aureus*, entre otras, pero escasa o moderada contra bacterias Gram negativas (9)(11)(31)(42). Sin embargo existen reportes que es activo contra estas bacterias en altas concentraciones (18). Muestra de esto es que las especies bacterianas *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus epidermidis* presentan gran sensibilidad frente al extracto, con respecto a *Candida albicans* (levadura), que muestra una sensibilidad menor, sin embargo, las bacterias *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, son las especies bacterianas resistentes en comparación a las bacterias Gram positivas (10).

Si hiciéramos una comparación de la sensibilidad de las bacterias usadas en este estudio, encontramos que las Gram positivas y la levadura *Candida albicans*, fueron las más sensibles, seguidos de las Gram negativas. El alto porcentaje de sensibilidad puede ser comparado con los antibióticos actuales incrementando las posibilidades del Propóleo en la rama farmacéutica.

Es por esto que el Propóleo es reconocido como un potente antibiótico de origen natural. En nuestro país, la capacidad antimicrobiana del extracto etanólico del Propóleo obtenido de varias zonas del estado de Chiapas, se hizo evidente en *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*, los flavonoides y fenoles encontrados en dicho estudio, están relacionados con esta actividad (17). El Propóleo se emplea empíricamente y rudimentariamente, sin embargo debido a su importancia, se están realizando diversos estudios para facilitar la producción del mismo.

Los estudios con propóleos de diversas ciudades muestran que la alta concentración de fenoles está directamente relacionado con su poder bactericida que es reproducible en las variedades encontradas a nivel mundial.

Estos datos concuerdan con estudios que menciona que la acción antibacteriana que es atribuida al extracto etanólico de Propóleo se debe principalmente a la presencia de metabolitos como son los flavonoides y los fenoles que posee.

El Propóleo es una sustancia compleja, constituida por una gran variedad de compuestos químicos, su composición no es estable y varía según la fuente de procedencia, se caracteriza por tener un 55% de resinas y bálsamos aromáticos, 30% de ceras, 10% de aceites esenciales y 5% granos de polen (48).

Algunos autores plantean la existencia de alrededor de 18 componentes y se señala que entre estos los principales son compuestos del tipo flavonoide, tales como, las flavonas, flavones y las flavononas. Se han reportado alrededor de 38 flavonas, 12 derivados del ácido benzoico, 14 derivados del alcohol cinámico y el ácido cinámico, 12 componentes entre alcoholes, cetonas y fenoles, 7 terpenos, 11 esteroides, 7 azúcares y 2 aminoácidos (48).

Los flavonoides presentes en los extractos son moléculas a seguir puesto que varían en contenido dentro de cada Propóleo pero su actividad biológica en microorganismos influye en las características y puede ser un motivo de seguimiento para combatir aquellas bacterias que presentan resistencia.

Hay estudios que demuestran que el contenido de flavonoides influye en la sensibilidad de *Pseudomonas aeruginosa* con un resultado satisfactorio en cuanto a la actividad del Propóleo proveniente de Campeche ensayado en la cepa (48).

Debido a la importancia de éstos compuestos, existen diversos estudios que demuestran la presencia ó ausencia de flavonoides y fenoles, mediante distintos métodos, algunos mencionan reacciones químicas, como el Ensayo de Shinoda, en donde los flavonoides con el núcleo de benzopirona (flavonas, flavonoles, flavanonas, etc.), producen coloraciones rojizas cuando a sus disoluciones acuosas o alcohólicas se les adiciona Mg seguido de HCl concentrado; Hay una variante, en donde al reemplazar el Mg por el Zn en dicho ensayo (Ensayo Zn/HCl), solamente los flavonoides producen coloraciones rojo-violeta. Las flavononas y flavonoles no producen color o producen coloraciones rosadas débiles (38). Y en el Ensayo de Pacheco el flavonoide sólido se calienta una llama con unos pocos cristales de AcONa y se adiciona 0.1 ml de anhídrido acético. Luego con 0.1 ml de HCl concentrado se produce un color rojo característico (38). Sin embargo los métodos cromatográficos también son ampliamente utilizados ya que los flavonoides al presentar estructuras fenólicas, pueden cambiar de color cuando se tratan con bases, particularmente con amoníaco, propiedad que permite su identificación; asimismo, contienen sistemas aromáticos conjugados, por lo que muestran bandas de absorción en las regiones del visible ultravioleta (38), estas propiedades son herramientas fundamentales ya que nos permiten correlacionar las estructuras de dichos compuestos y la actividad biológica.

Otra ventaja de los flavonoides es que pueden detectarse rápidamente en los cromatogramas sin usar reactivos cromógenos. Muchos son coloridos, y los que no pueden verse por medio de la luz ultravioleta, ya que dan diversidad de manchas coloridas: moradas, cafés, verdes o amarillas; además muchos cambian de color cuando se tratan con amoniaco, color que es reversible. También pueden ser cuantificados por otro tipo de técnicas de separación como son: HPLC, CG y MS (38).

El mecanismo de acción del extracto de Propóleo está íntimamente relacionado con las estructuras químicas que posee, por lo cual la identificación de las mismas es fundamental para la comprensión del mismo.

El mecanismo antimicrobiano del Propóleo es complejo y atribuido al sinergismo de la actividad de los compuestos fenólicos y otros componentes, principalmente a los flavonoides pinocembrina, galangina y pinobanksina. También se han informado de varios mecanismos de la actividad del Propóleo sobre el crecimiento bacteriano: inhibición de la división celular; colapso de pared celular, membrana celular ó citoplasma bacteriano; lisis bacteriana; inhibición de la síntesis de proteínas.

Galangina y ácido caféico del extracto de Propóleo son inhibidores enzimáticos del metabolismo bacteriano. El mecanismo del Propóleo puede variar de acuerdo a su composición y puede ser explicado por el sinergismo entre las sustancias activas encontradas en el Propóleo (33). Existen estudios que sugieren que la actividad antimicrobiana de los productos naturales se basa en el deterioro de varios sistemas enzimáticos, incluidos aquellos involucrados en la producción de energía y en la síntesis de componentes estructurales. Una vez que el compuesto fenólico cruza la membrana celular, puede interactuar con las enzimas y con las proteínas causando un flujo contrario de protones a través de ella, afectando así la actividad celular (55).

Algunos estudios sugieren que 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 (50).

En cuanto a las propiedades físicas del Propóleo, existe una variación en los colores obtenidos, los cuales van desde el ámbar claro al café oscuro, pasando por el amarillo, el pardo y rojo. Esta variación era esperada ya que, la coloración de los propóleos depende de la vegetación existente en las zonas donde se ubican las colmenas (44). En nuestro país en el estado de Chiapas existen reportes de coloraciones café-oscuro, café-verde, verde-oscuro y Negro (17).

Existe un estudio que demuestra que los rendimientos de manera general se obtienen valores superiores en el total de sólidos solubles extraídos con el etanol que al utilizar agua como solvente, además de que las concentraciones requeridas para inhibir a las bacterias son menores para los extractos etanólicos, lo que indica que los primeros pueden ser más efectivos. Lo que implica que tanto la procedencia del Propóleo, el tipo de extracto utilizado, así como la especie de microorganismo evaluado determinan la efectividad antimicrobiana del Propóleo (48).

Se utilizó la Técnica de Microdilución que nos ofreció ciertas ventajas que fueron importantes para nuestro trabajo, ya que obtuvimos resultados cualitativos y cuantitativos (CMB) y/o la (CMI) de las bacterias en cuestión, gracias a que los volúmenes de los reactivos que se ocupan son muy pequeños esto nos permitió optimizar y economizar el trabajo, el material, el espacio y el tiempo esto en una misma microplaca se pueden ensayar hasta 8 bacterias diferentes si así se desea.

La Técnica de Microdilución ofrece ciertas ventajas que son importantes para nuestro trabajo, ya que arroja resultados cualitativos y cuantitativos (CMB) y/o la (CMI) de las bacterias en cuestión, gracias a que los volúmenes de los reactivos que se ocupan son muy pequeños esto permite optimizar y economizar el trabajo, el material, el espacio y el tiempo esto en una misma microplaca se pueden ensayar hasta 8 bacterias diferentes si así se desea.

Además de realizar la Técnica de Microdilución también se utilizó la técnica de Moosmann ya que es un ensayo colorimétrico basado en la capacidad de las enzimas deshidrogenasas de las células viables para transformar la sal MTT tetrazolium a MTT formazan, por medio de esta técnica se ha determinado el efecto citotóxico de algunos extractos sobre líneas células o las CMI sobre bacterias como *Helicobacter pylori*, *Streptococcus* Grupo A, *Escherichae coli* entre otras, obteniendo resultados importantes. Apoyándonos en este fundamento, y sabiendo que las bacterias producen este tipo de enzimas necesarias para generar ATP, donde la reacción es simple y por lo tanto el MTT (oxidado) de color amarillo pasa a la forma MTT formazan (reducido) originando un precipitado púrpura, ver figura, podemos interpretar que la bacteria se encuentra viable a partir del pozo ya que está produciendo las enzimas capaces de transformar al colorante, posteriormente se tomó la lectura en el Espectrofotómetro a

una longitud de onda de 575 nm con un filtro de referencia de 610 nm donde la intensidad del colorante será proporcional al número de bacterias vivas presentes (44). De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente estudio, se seleccionó a la bacteria Gram positiva, *Streptococcus* del Grupo D, por la alta sensibilidad que presentó frente al extracto de Propóleo y a las bacterias Gram negativas, *Salmonella typhi* y *Klebsiella pneumoniae*, por la sensibilidad disminuida de este grupo de bacterias para realizar observaciones en el Microscopio Electrónico de Transmisión. Se obtuvieron varias microfotografías, de 6 muestras, de las cuales 3 correspondieron a un control positivo, no tratado, de cada una de las diferentes bacterias estudiadas y las 3 muestras restantes corresponden a las bacterias tratadas con el extracto de Propóleo.

Para poder observar a los microorganismos se empleó el método de tinción negativa, el cual emplea el ácido fosfotúngstico, que tiene como elemento activo el tungsteno, por el gran peso molecular de este ácido las tinciones electrónicas denotan una gran resistencia al bombardeo del haz de electrones en el microscopio electrónico de transmisión, el ácido fosfotúngstico es un excelente colorante electrónico de tipo general y específicamente con selectividad para los componentes extracelulares como mucopolisacárido y membranas basales (44).

Las observaciones al microscopio electrónico tienen como finalidad determinar si existe alguna alteración en las bacterias en cuanto a su morfología y estructura (44). De acuerdo a los resultados obtenidos, tanto en la Técnica de Microdilución en caldo y el Ensayo del MTT modificado, *Streptococcus* Grupo D corresponde a una de las bacterias más sensibles frente al extracto, lo cual se evidencia al realizar la tinción negativa y mediante la observación de la morfología bacteriana en el Microscopio Electrónico de Transmisión.

Dada la concentración de solutos que se alcanza en el interior de la célula bacteriana, se desarrolla una considerable presión de turgencia (fenómeno por el cual las células al absorber agua, se hinchan, ejerciendo presión contra las membranas celulares). Para resistir esta presión las bacterias necesitan paredes celulares, que además son las responsables de la forma y la rigidez de la célula (32).

Ciertos agentes son capaces de destruir el peptidoglicano característico de la bacteria. Uno de dichos agentes es la enzima lisozima, una proteína que escinde en el peptidoglicano las uniones glucosídicas 1,4 entre la N-acetilglucosamina y el ácido N-acetilmurámico debilitando así la pared. El resultado es la penetración del agua en la célula que se hincha y acaba por estallar, un proceso denominado lisis. La lisozima abunda en las secreciones animales como lágrimas, saliva y otros fluidos corporales (32).

Cuando el agua difunde desde una región de elevada concentración (baja concentración de soluto) o/u otra en que la concentración de agua es menor (concentración de soluto más alta), es un proceso que denominamos osmosis. La mayoría de las veces, el citoplasma celular posee una mayor concentración de solutos que el medio exterior, de modo que el agua difunde hacia el interior de la célula, diciéndose entonces que hay un balance de agua positivo. Sin embargo, cuando una célula está en un ambiente con baja actividad de agua, existe una tendencia de salida del agua intracelular. Por lo tanto, cuando una célula se introduce en una solución con baja actividad de agua, tal como una disolución de sal o azúcar, pierde agua y se produce plasmólisis (32).

La adición al medio de una concentración adecuada de un soluto que no es capaz de penetrar en la célula, como la sacarosa, establece un desequilibrio entre la concentración del soluto en el exterior y el interior de la célula. Cuando en estas condiciones, se compensa la presión de turgencia, la lisozima todavía es capaz de digerir el peptidoglicano, pero no causa la lisis y se forma un protoplasto (célula bacteriana desprovista totalmente de pared celular). Cuando se colocan en agua estos protoplastos estabilizados en una determinada concentración de sacarosa, se produce rápidamente lisis. El término esferoplasto se utiliza frecuentemente como sinónimo de protoplasto, aunque las dos palabras poseen significados algo distintos: los protoplastos por lo general carecen de restos de pared celular y se forman a partir de bacterias Gram positivas, a diferencia de los esferoplastos en los que habitualmente existen porciones de pared unidas a la estructura que rodea a la membrana de las bacterias Gram negativas (32).

Los protoplastos anteceden a la lisis de bacterias Gram positivas, se forman porque la pared celular se debilita y se pierde, por lo cual el agua puede entonces entrar a la célula y esta se hincha y explota en un fenómeno de lisis (44).

En *Streptococcus* Grupo D, puede existir la formación de protoplastos, sin embargo observamos en las figuras que los bordes que delimitan la pared celular de la bacteria no se encuentran bien definidos, y que el tamaño de la bacteria se encuentra disminuido de una manera notable, lo que sugiere que tal vez el efecto del extracto de Propóleo en la bacteria sea a nivel de membrana celular, ya que la forma irregular que presenta no es la normal y el tamaño se ve afectado, ya sea porque impide la formación de la membrana celular o bien interfiere con el crecimiento normal de los cocos.

Salmonella typhi corresponde a una de las bacterias Gram (-) junto con *Klebsiella pneumoniae* que fueron menos susceptibles en comparación con las Gram (+), y que de acuerdo a los resultados obtenidos anteriormente, como era de esperarse las bacterias presentan un tamaño normal, la definición de la pared celular es la adecuada, incluso se observan los flagelos de salmonella, y las colonias tienen un aspecto normal, lo anterior nos permite dilucidar que no existe daño alguno en estas bacterias.

Las diferencias en la composición química del Propóleo dificultan la determinación satisfactoria de su calidad con los métodos químicos disponibles (10).

8. CONCLUSIONES

- ✓ Se evaluó la actividad antimicrobiana del extracto de Propóleo en bacterias de importancia clínica, ya que se logró determinar la CMB y/o la CMI así como el efecto bactericida y/o bacteriostático.
- ✓ Se logró la identificación de las bacterias, mediante pruebas bioquímicas, que correspondieron con los resultados propios de dichas cepas.
- ✓ Se preparó el Extracto de Propóleo (Solución de Trabajo), siguiendo la metodología descrita para su elaboración. La ST presentó una concentración de 100 µg/µl.
- ✓ Se determinó la CMI y/o la CMB, del extracto de Propóleo en cada una de las cepas bacterianas, utilizando la Técnica de Microdilución en Caldo, y evidenciado por el Ensayo de MTT modificado.
- ✓ Se determinó el efecto bactericida y/o bacteriostático del extracto de Propóleo, tomando en cuenta la CMB, CMI y el crecimiento de las estrías realizadas en las placas de agar MH de cada uno de los pozos tanto problemas, control positivo, negativo y el blanco de cada una de las bacterias.
- ✓ Creemos que hubo daño, producido por el extracto de Propóleo en determinadas cepas bacterianas, ya que se observaron ciertas variaciones estructurales a nivel de pared y membrana celular, en las microfotografías obtenidas, por medio de Microscopia Electrónica de Transmisión, pero hacen falta más estudios para poder asegurarlo.

9. SUGERENCIAS

Como el Propóleo es considerado un antimicrobiano de amplio espectro se sugieren mas estudios in vitro sobre una población de bacterias Gram (+) y Gram (-), así como el efecto tóxico del extracto de Propóleo en líneas celulares.

Es necesario realizar más estudios que permitan estandarizar la calidad de los procesos y caracterizar nuestro Propóleo.

El Propóleo contiene elementos indispensables para coadyuvar en la cura de diferentes padecimientos, lo que puede constituir parte de la medicina alternativa, siempre y cuando la investigación de este producto se encuentre avalada por ensayos clínicos.

10. APÉNDICE

10.1 Aislamiento de bacterias

Las cepas utilizadas, fueron aisladas previamente de muestras clínicas y proporcionadas por el laboratorio Núm.10, de Microbiología Experimental de la Unidad de Posgrado Campo 1, de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

Tabla 7.- Cepas utilizadas en el presente estudio

Bacterias Gram (+) y <i>Candida albicans</i> (levadura)		Bacterias Gram (-)	
1.	<i>Candida albicans</i> (levadura)	11.	<i>Enterobacter aerogenes</i>
2.	<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	12.	<i>Enterobacter cloacae</i>
3.	<i>Streptococcus</i> grupo D	13.	<i>Escherichia coli</i>
4.	<i>Listeria monocytogenes</i>	14.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
5.	<i>Staphylococcus aureus</i>	16.	<i>Pasteurella multocida</i>
6.	<i>Staphylococcus aureus B-Lisina</i>	17.	<i>Proteus mirabilis</i>
7.	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	18.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
8.	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	19.	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
9.	<i>Streptococcus agalactiae</i>	20.	<i>Salmonella typhi</i>
10.	<i>Streptococcus pyogenes</i>	21.	<i>Vibrio cholerae</i>

10.2 Métodos de identificación bacteriana

En el presente estudio, los métodos de identificación bacteriana fueron seleccionados de acuerdo al género y especie a la que pertenece cada cepa.

Tabla 8.- Pruebas de identificación realizadas a la levadura *Candida albicans* (levadura).

PRUEBA	<i>Candida albicans</i> (levadura)
Morfología Colonial	Las colonias suelen ser pálidas, de blancas a amarronadas y opacas. Pueden ser lisas ó rugosas, centro ligeramente prominente, con olor a levadura.
Tinción	Gram (+)
Tubo germinativo	Observación de la formación de un tubo germinal, con forma de espejo de mano.

Tabla 9.- Pruebas de identificación realizadas a la bacteria *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

PRUEBA	<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>
Morfología Colonial	En AS, colonias pequeñas, blancas ó amarillas, opacas, reseca y planas. En AS con telurito de potasio, crecen colonias negras.
Hemólisis	β , alrededor de las colonias
Tinción	Gram (+)
Morfología Celular	bacilos pleomórficos, empalillados, letras chinas
Atmósfera	Anaerobio facultativo
Catalasa	+
Ureasa	+
Motilidad	-
Manitol	+
Glucosa	+

+= (Positivo); -= (Negativo)

Tabla 10.- Pruebas de identificación realizadas a las enterobacterias.

BACTERIA	<i>Enterobacter aerogenes</i>		<i>Enterobacter cloacae</i>		<i>Escherichia coli</i>		<i>Klebsiella pneumoniae</i>		<i>Proteus mirabilis</i>		<i>Salmonella typhi</i>		<i>Vibrio Cholerae</i>	
	En	AS	En	AS	En	AS	En	AS	En	AS	En	AS	En	AS
<i>Morfología colonial</i>	colonias medianas grises		colonias medianas grises		colonias medianas grises		colonias medianas grises		colonias medianas grises		colonias medianas grises		colonias medianas grises	
<i>Tinción</i>	Gram (-)		Gram (-)		Gram (-)		Gram (-)		Gram (-)		Gram (-)		Gram (-)	
<i>Morfología celular</i>	bacilos		bacilos		bacilos		bacilos		bacilos		bacilos		bacilos	
<i>Catalasa</i>	+		+		+		+		+		+			
<i>Oxidasa</i>	-		-		-		-		-		-			
<i>Lactosa</i>	+		+		+		+		-		-			
<i>Citratos</i>	+		+		-		+		+/-		-		+	
<i>Urea</i>	-		-		-		+		+		-		-	
<i>Voges Proskahuer</i>	+		+		-		+		-		-		+	
<i>Manitol</i>	+		+		+		+		+		+		+	
<i>Sacarosa</i>	+		+		-		+		-		-		+	
<i>Lisina</i>	+		+		+		+		+		+		+	

+= (Positivo); -= (Negativo); +/- = (La mayoría positivos a esta prueba)

Tabla 11.- Pruebas de identificación realizadas a la bacteria *Listeria monocytogenes*.

PRUEBA	<i>Listeria monocytogenes</i>
Morfología colonial	Colonias pequeñas, semi- transparentes
Hemólisis	β
Tinción	Gram (+)
Morfología celular	bacilos
Catalasa	+
Motilidad a 25°C	+
RM	+
Glucosa	+
Manitol	+

+= (Positivo); -= (Negativo).

Tabla 12.- Pruebas de identificación realizadas a la bacteria *Pasteurella multocida*.

PRUEBA	<i>Pasteurella multocida</i>
Morfología colonial	MH, ACh, AS, Colonias grandes, mantequillosas, gris azulado brillantes, lisas, olor rancio (indol)
Tinción	Gram (-)
Morfología celular	Cocobacilos pleomórfico
Atmósfera	Anaerobio facultativo
Catalasa	+
Oxidasa	+
Nitratos	+
Indol	+
Ornitina	+
Urea	-

Tabla 13.- Pruebas de identificación realizadas a las especies de *Pseudomonas* spp.

PRUEBA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Morfología colonial	En AS, colonias medianas grises ó azuladas.	En AS, colonias pequeñas grises
Tinción	Gram (-)	Gram (-)
Morfología celular	bacilos rectos ó curvos	bacilos rectos ó curvos
Atmósfera	O ₂	O ₂
Oxidasa	+	+
Catalasa	+	+
Motilidad	+	+
Pioverdina	+	+
Glucosa	+	+
Maltosa	V	V
Lactosa	-	-
Manitol	V	+
Arginina	+	+
Lisina	-	-
Urea	V	-
Citratos	+	V
Gelatinasa	+	-

V= (Variable); += (Positivo); -= (Negativo)

Tabla 14.- Pruebas de identificación realizadas a las especies de *Staphylococcus* spp.

PRUEBA	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> B-Lisina	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
Morfología colonial	En AS colonias medianas, cóncavas, brillantes, blancas ó grises, amarillas ó naranjas y cremosas	En AS colonias medianas, blancas cremosas	En AS colonias medianas, blancas y cremosas	En AS colonias blancas brillantes
Hemólisis	β	β	α	α
Tinción	Gram (+)	Gram (+)	Gram (+)	Gram (+)
Morfología celular	cocos en racimos	cocos en racimos	cocos en racimos	cocos en racimos
Atmósfera	O ₂	O ₂	O ₂	O ₂
Catalasa	+	+	+	+
Oxidativa/ Fermentativa	F	F	F	F
Coagulasa	+	+	-	-
Manitol	+	+	-	-
Novobiocina 5 µcg	R	R	S	R
Ureasa	NA	NA	+	-

S= (Sensible); R= (Resistente); NA= (No Aplica).

Tabla 15.- Pruebas de identificación realizadas a las especies de *Streptococcus* spp.

PRUEBA	<i>Streptococcus pyogenes</i> (A)	<i>Streptococcus agalactiae</i> (B)	<i>Streptococcus</i> del grupo (D)
Morfología colonial	En AS, colonias chicas, lisas	En AS, colonias puntiformes, lisas, semitransparentes	En AS, colonias puntiformes, lisas, semitransparentes
Hemólisis	β	β	γ
Tinción	Gram (+)	Gram (+)	Gram (+)
Morfología celular	cocos en cadenas	cocos en cadenas	cocos en cadenas
Atmósfera	CO ₂	CO ₂	CO ₂
Oxidasa	-	-	-
Catalasa	-	-	-
Bacitracina 0.04 U.I.	S	R	R
CAMP	-	+	-
Hidrólisis de Hipurato	-	+	-
Bilis Esculina	-	-	+
NaCl 6.5%	-	-	+

S= (Sensible); R= (Resistente);

10.3 Absorbancias y resultados cualitativos, obtenidos del ensayo en microplaca tanto de las bacterias Gram (+), candida albicans (levadura) y Gram (-), tratadas con el extracto de Propóleo.

Tabla 16.- Valores de absorbancia del ensayo en microplaca de las bacterias Gram (+) y de *Candida albicans* (levadura), tratadas con el extracto de Propóleo.

1.	<i>Candida albicans</i> (levadura)
2.	<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>
3.	<i>Streptococcus</i> grupo D
4.	<i>Listeria monocytogenes</i>
5.	<i>Staphylococcus aureus</i>
6.	<i>Staphylococcus aureus</i> B-Lisina
7.	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
8.	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>
9.	<i>Streptococcus agalactiae</i>
10.	<i>Streptococcus pyogenes</i>

µg/µl	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
100,000	0.7065	0.5691	0.581	0.04924	0.1458	0.7978	0.0692	0.1001	0.109	0.3648
50,000	0.7065	0.5691	0.581	0.04924	0.1458	0.7978	0.0692	0.1001	0.109	0.3648
25,000	0.7065	0.5691	0.581	0.04924	0.1458	0.7978	0.0692	0.1001	0.109	0.3648
12,500	0.7065	0.5691	0.581	0.04924	0.5624	0.7978	0.0692	0.1001	0.109	0.3648
6,250	0.7065	0.5691	0.581	0.04924	0.7784	0.7978	0.0692	0.1001	0.2667	0.3648
3,125	0.7065	0.5691	0.581	0.9652	0.9147	0.7978	0.0692	0.1001	0.4362	0.3648
1,560	0.7065	0.5691	2.6448	1.7611	1.104	0.7978	0.0692	0.1001	0.6151	0.3648
781.25	0.7065	0.5691	2.7817	1.7611	1.253	1.2634	0.0692	0.1001	0.7532	1.9958
390.63	0.7065	0.6912	2.7819	1.7611	1.529	1.7513	0.0692	0.1001	0.8521	2.1658
Control (+)	2.2077	1.4005	3	1.8365	2.2077	2.0203	2.99	2.0742	1.6469	2.3461
Control (-)	0.8001	0.5703	0.623	0.04924	0.1499	0.8001	0.0748	0.0998	0.159	0.3175

Tabla 17.- Resultados cualitativos obtenidos en microplaca de las bacterias Gram (+) y de *Candida albicans* (levadura), tratadas con el extracto de Propóleo.

$\mu\text{g}/\mu\text{l}$	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
100,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12,500	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
6,250	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
3,125	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-
1,560	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-
781.25	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+
390.63	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+
Control (+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Control (-)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Blanco	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ (Crecimiento)

-(Inhibición)

Tabla 18.- Valores de absorbancia del ensayo en microplaca de las bacterias Gram (-) tratadas con el extracto de Propóleo.

Bacterias Gram (-)	
11.	<i>Enterobacter aerogenes</i>
12.	<i>Enterobacter cloacae</i>
13.	<i>Escherichia coli</i>
14.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
15.	<i>Pasteurella multocida</i>
16.	<i>Proteus mirabilis</i>
17.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
18.	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
19.	<i>Salmonella typhi</i>
20.	<i>Vibrio cholerae</i>

$\mu\text{g}/\mu\text{l}$	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
100,000	0.01	0.01	0.01	0.01	0.6618	0.2229	0.01	0.01	0.01	0.9287
50,000	0.01	0.01	0.01	0.01	0.6618	0.2229	0.01	0.01	0.01	0.9287
25,000	0.01	0.2031	0.01	0.01	0.6618	0.2229	1.1	0.3912	0.01	0.9287
12,500	0.8742	0.2936	0.01	0.01	0.6618	0.2229	1.115	0.4112	0.3969	0.9287
6,250	1.9802	0.4001	0.2888	0.01	0.6618	0.2229	1.256	0.5682	0.4094	0.9287
3,125	1.9802	0.5819	0.4972	1.4112	0.6618	0.4311	1.492	0.7203	0.413	0.9287
1,560	1.9802	0.7112	0.8027	2.99	0.6618	0.6712	1.597	0.8999	0.4145	0.9287
781.25	1.9802	0.9004	1.0109	2.99	0.6618	0.8743	1.7033	0.9234	0.4155	1.2843
390.63	1.9802	1.0404	1.3271	2.99	1.5698	0.9399	1.9009	1.112	0.7996	1.589
Control (+)	2.7566	1.5627	2.0671	3	2.944	2.5252	2.3411	2.01	2.1528	1.7608
Control (-)	0.0807	0.1026	0.1117	0.1251	0.6816	0.3115	0.7342	0.0595	0.0598	0.931

Tabla 19.- Resultados cualitativos obtenidos en microplaca de las bacterias Gram (-) tratadas con el extracto de Propóleo.

$\mu\text{g}/\mu\text{l}$	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
100,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25,000	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-
12,500	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-
6,250	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
3,125	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
1,560	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
781.25	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
390.63	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Control (+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Control (-)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Blanco	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ (Crecimiento)

- (Inhibición)

10.4 Material, equipo y reactivos.

10.4.1 Material

- Asa bacteriológica.
- Cajas petri de vidrio estériles.
- Campana servidora.
- Cinta adhesiva.
- Embudo de vidrio.
- Espátula.
- Frascos ámbar de 20, 50, 100, 250, 500 y 1000 ml.
- Frasco dosificador.
- Filtro bala.
- Gradilla.
- Manguera de látex.
- Marcador indeleble.
- Matraz aforado de 100 ml.
- Matraz erlenmeyer de 250, 500 y 1000 ml.
- Micro pipeta de 0.5, 2-10 y 100 μ l.
- Mechero bunsen.
- Membrana milipore 0.22, 0.45 y 0.8 μ l.
- Papel filtro.
- Pipetas graduadas de 1, 2, 5 y 10 ml.
- Probeta graduada de 100, 250 y 500 ml.
- Puntas para micropipetas 0.5, 2-10, 100 μ l.
- Soporte universal.
- Termómetro.
- Tubos de vidrio con tapón de rosca.
- Vaso de precipitado de 50, 100, 250, 500 y 1000 ml.
- Varilla de vidrio.

10.4.2 Material biológico

- *Cepa de Candida albicans*
- *Cepa de Corynebacterium pseudotuberculosis*
- *Cepa de Enterococcus*
- *Cepa de Enterobacter aerogenes*
- *Cepa de Enterobacter cloacae*
- *Cepa de Escherichia coli*
- *Cepa de Klebsiella pneumoniae*
- *Cepa de Listeria monocytogenes*
- *Cepa de Pasteurella multocida*
- *Cepa de Proteus mirabilis*
- *Cepa de Pseudomonas aeruginosa*
- *Cepa de Pseudomonas fluorescens*
- *Cepa de Salmonella typhi*
- *Cepa de Staphylococcus aureus*
- *Cepa de Staphylococcus B-Lisina*
- *Cepa de Staphylococcus epidermidis*
- *Cepa de Staphylococcus saprophyticus*
- *Cepa de Streptococcus agalactiae*
- *Cepa de Streptococcus pyogenes*
- *Cepa de Vibrio cholerae*
- Propóleo en bruto.

10.4.3 Equipo

- Agitador Vortex Genie 2 Scientifi Industries ModeloG560.
- Autoclave All American Modelo 1925X.
- Balanza Analítica.
- Balanza Granataria.
- Bomba de vacío Hoffmann Pinther Modelo 0210.
- Centrífuga Dynac.
- Espectrofotómetro SANOFI DIAGNOSTICS PASTEUR RV.
- Estufa bacteriológica Ríos Rocha S.A.
- Estufa orbital New Brunswick Scientific, Serie 25.
- Horno Pasteur Ríos S.A. Modelo HS-41.
- Microscopio Electrónico de Transmisión (JEOL JEM 100 S).
- Microscopio Óptico Olympus Modelo 1925X.
- Parrilla con agitadores NOUVA II Stir Plate.
- Parilla con agitadores NOUVA 22 Stir Plate.
- Refrigerador JEM.

10.4.4 Reactivos

- Ácido fosfotungstico.
- Agua destilada.
- Cloruro de Sodio.
- Dimetil Sulfoxido (DMSO).
- Etanol al 70%.
- Glutaraldehído.
- Medio Agar Ceftriaxona.
- Medio Agar Citrato de Simmons.
- Medio Agar Dextrosa Sabouraud (SDA).
- Medio Agar Infusión Cerebro Corazón (BHI).
- Medio Agar MacConkey (MC).
- Medio Agar Muller Hinton (MH).
- Medio Agar Nutritivo (AN).
- Medio Agar Sales Manitol (SM).
- Medio Agar Salmonella Shigella (SS).
- Medio Agar Sangre (AS).
- Medio Agar Soya Trypticase (TSA).
- Medio Agar Tiosulfato, Citrato, Sales de bilis, Sacarosa (TCBS).
- Medio Agar Urea de Christensen.
- Medio Caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI).
- Medio Eosina Azul de Metileno (EMB).
- MTT SIGMA M-2128.
- Solución buffer de fosfatos PBS.
- Solución Salina Fisiológica Estéril.

10.4.4.1 Preparación de reactivos

- Ácido fosfotungstico: El ácido es una solución al 2% ajustada al pH de 7.0, mediante NaOH 1N (44).
- GLUTARALDEHÍDO-PARAFORMALDEHÍDO (KARNOSKY): Prepare una solución de amortiguador de fosfatos al 0.2 M o una solución de cacodilato al 0.2 N al pH de 7.0. (44).

Prepare una solución de paraformaldehído al 10% disolviendo 2g de paraformaldehído en polvo en 20 ml de agua destilada calentando a 60-70°C mientras se agita vigorosamente (en campana de extracción de gases). Agregue una gotas de NaOH 0.2 N, hasta que la solución se vuelva transparente. Dejar enfriar.

Una vez fría la solución se prepara el fijador:

Amortiguador de fosfatos al 0.2 M.....	50 ml
Paraformaldehído al 10% en agua.....	20 ml
Glutaraldehído al 25% en agua.....	10 ml
Agua destilada hasta volumen final de.....	100 ml

- MTT: Disolver MTT en RPMI-1640 rojo de fenol, hasta una concentración de 5mg/ml (44).
- SSFE: Por cada 100 ml de agua destilada agregar 850 ml de NaCl. Esterilizar en autoclave a 121 °C a 15 lbs por 15 min (440).

11. REFERENCIAS

1. Asís M., 1989. Los productos de la colmena. Centro de Información y Documentación, Agropecuario. La Habana, Cuba, p. 45 – 52.
2. Bedascarrasbure E., Gurini L., Maldonado L., Et al, 2000. Informe del Primer Año del “Proyecto de Caracterización Físico-química del propóleo argentino y sus extractos”. PICT. N° 08-03862.
3. Benkovic V., Kopjar N., Horvat-Knezevic A., Et al. 2008. Evaluation of Radioprotective Effects of Propolis and Quercetin on Human White Blood Cells *in Vitro*. *Biol. Pharm.* 31:1778-1785.
4. Bonilla J., Mesón G., Cartín, W., 1993. Modificación de un método colorimétrico que usa XTT, para la determinación de linfoproliferación. Universidad de Costa Rica. Facultad de Microbiología. Costa Rica. Págs. 19-20.
5. Boyanova L., Derejian S., Koumanova R., Et al, 2003. Inhibition of *Helicobacter pylori* Growth in Vitro by Bulgarian Propolis: Preliminary Report. *J. Med. Microbiol*; 52:417-419.
6. Burdock G., Et al, 1998. Review of the Biological Properties and Toxicity of Bee Propolis. *Food Chem. Toxicol*; 36:347-363.
7. Chen C., Wu C., Shy H., Et al, 2003. Cytotoxic Prenylflavonones from Taiwanese Propolis. *J. Natural Prod*; 66:503-506.
8. Cortés Juárez A, Cruz Jiménez G., Licea Vega J.A., Et al. (2008). Efecto Inhibitorio del Extracto de Propóleo Sobre *Nocardia asteroides*, Aislada de Vacas con Mastitis. Tesis de licenciatura QFB: UNAM FES-C. Edo. de México Cuautitlán Izcalli. Págs. 31,32
9. Davey R., Grange J., 1990. Antibacterial Properties of Propolis (Bee glue). *J. R. Soc. Med*; 83: 159-160.
10. Dizaji A., Valizadeh E., Alishah H., Et al, 2008. Chemical Composition Analysis and Antimicrobial Activity of Iranian Propolis. *Research Journal of Biological Sciences*; 3(5):448-450.

11. Dobrowolski J., Vohora S., Sharma K., Et al. 1991. Antibacterial, Antifungal, Antiamoebic, Antiinflammatory and Antipyretic Studies on Propolis Bee Products. *J. Ethnopharmacol*; 35: 77-82.
12. Drago L., Mombelli B., De Vecchi E., Et al, 2001. *In Vitro* Antimicrobial Activity of Propolis Dry Extract. *J. Chemother*; 13(1):102.
13. Duarte S., Koo H., Bowen W., Et al, 2003. Effect of a Novel Type of Propolis and its Chemicals Fractions on Glucosyltransferases and on Growth and Adherence of Mutans Streptococci. *Biol. Pharmaceutical Bull*; 26:527-531.
14. Durand M., Calderwood S., Weber D., Et al. 1993. Acute Bacterial Meningitis in Adults: a Review of 493 Episodes. *N. Engl. J. Med*; 328:21.
15. Dussart E., 2007. Taller de Elaboración de Subproductos de la Miel y las Colmenas, Managua, Nicaragua.
16. Estevao S., Gallardo, A., Abalos A., Et al, 2006. Actualización Sobre Linfadenitis Caseosa: El Agente Etiológico y la Enfermedad. *Revista Veterinaria Argentina*; 23(224): 258-278.
17. Flores A., Leyra J., De La Torre R., Et al, 2006. Análisis Físicoquímico y Actividad Antimicrobiana de Propoleos del Estado de Chiapas, Notiabeja. Núm. 1 y 2.
18. Sforcin J., Fernandes A., Lopes C., Et al, 2000. Seasonal Effect on Brazilian Propolis Antibacterial Activity. *J. Ethnopharmacol*; 73: 243-249.
19. Gallardo N. 2004. Imagen Veterinaria Abejas. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, volumen 4, número 1, año 4, enero-marzo. Pp 68.
20. Ramos A., Hernandez W., Nodarse R., Et al, 2006. Detección Precoz de Enterobacterias Productoras de Betalactamasas de Espectro Extendido en Pacientes Graves. *Revista Cubana de Medicina Intensiva y Emergencias*; 5(1).

21. Gutiérrez S., Romero C., Hidalgo C., Et al. 1999. Acción Antibacteriana de la Tintura Hidroalcohólica de Propóleos al 4% en Gérmenes de Origen Endodóncico. *Archivo Médico de Camaguey*; 3(4).
22. Hayacibara M., Koo H., Rosalen P., Et al, 2005. *In Vitro* and *In Vivo* Effects of Isolated Fractions of Brazilian Propolis on Caries Development. *J. Ethnopharmacol*; 101:371-376.
23. Hellner M, Winter D, Von Georgi R, Munstedt K. 2007. Apitherapy: Usage And Experience In German Beekeepers. *Evid Based Complement Alternat Med* 2007; 49:1-7.
24. Hernández, A. 2001. Factores de Riesgo y Coste Económico de la Infección Nosocomial en un Hospital de Ámbito Comarcal. Universidad Autónoma de Barcelona. Facultad de Medicina. Barcelona, España.
25. Huleihel M., Isanu V. 2002. Anti-herpes Simplex Virus Effect of Aqueous Extract of Propolis. *Isr. Med. Assoc. J*; 4(11): 923-927.
26. Kim D., Lee G., Aum S., Et al. 2008. Preparación of Propolis Nanofood and Application to Human Cancer. *Biol. Pharm. Bull.* 2008; 31: 1704-1710.
27. Kilicoglu S., Kilicoglu B., Erdemli E. 2008. Ultraestructural view of colon anastomosis Ander propolis effect by transmisión electron microscopy. *World J Gastroenterol* 2008;14 (30):4763-4770.
28. Koo H., Rosalen P., Cury J., Et al, 2002. Effects of Compounds Found in Propolis on *Streptococcus mutans* Growth and on Glucosyltransferase Activity. *Antimicrob. Agents Chemother*; 46(5): 1302-1309.
29. Koo H., Rosalen P., Cury J., Et al, 2000. Effect of a Next Variety of *Apis mellifera* Propolis on Mutans Streptococci. *Curr. Microbiol*; 33: 393-400.
30. Kumazawa S., Hamasaka T., Nakayama T. 2004. Antioxidant Activity of Propolis of Various Geographic Origins. *Food Chem*; 84:329-339.
31. Lu L., Chen Y., Chou C. 2003. Antibacterial and DPPH Free Radical-scavenging Activities of the Ethanol Extract of Propolis Collected in Taiwan. *J. Food Drug Anal*; 11: 277-282.

32. Madigan M., Martinko J., Parker J. 1999. *Biología de los Microorganismos*. 8ª edición, Ed. Prentice Hall Iberia, España, Madrid. Págs. 74-76; 916-917.
33. Mantovani R., Rall V., Batalha J., Et al, 2008. Anti-coagulase-negative *Staphylococcus* Activity of Ethanolic Extracts of Propolis from Two Brazilian Regions and Synergism with Antimicrobial Drugs by the E-test Method. *J. Venom Anim. Toxins Incl. Trop. Dis*; 14(2): 357-365.
34. Martínez I. 2002. Principios Básicos sobre Propóleos. Boletín del Colmenar. Año 8, Núm. 43.
35. Martínez L. 2010. El Propóleo y las Técnicas para su colecta, Notiabeja. Núm. 6.
36. Martínez L. 2011. El Propóleo y las Técnicas para su colecta, Notiabeja. Núm. 1 y 2.
37. Martínez I., Escobar del Campo M., Socarrás M. Et al. 2003. Eficacia del Propóleo al 10% en el Tratamiento de la Cervicitis Aguda. *Archivo Médico de Camaguey*; 7(4).
38. Miranda R., Arroyo G., Velasco B. Manual Introductorio a los Productos. Manual Introductorio a los Productos Naturales. FESC. Proyecto papime 192089.
39. Moreno Z., Martínez P., Figueroa J., 2007. Efecto Antimicrobiano *In Vitro* de Propóleos Argentinos, Colombianos y Cubano sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175. *Nova*; 7: 70-75.
40. Murray P., Rosenthal K., Pfaller M., Et al, 2006. *Microbiología Médica*. 5ª edición, Ed. Elsevier, Madrid, España. Págs. 375,779-780, 783; 916-917; 919-926.
41. Nagai T., Inoue R., Inoue H., Et al, 2003. Preparation and Antioxidant Properties of Water Extract of Propolis. *Food Chem*; 80: 29-33.
42. Nieva M., Isla M., Cudmani N., Et al, 1999. Screening of Antibacterial Activity of Amaicha del Valle (Tucumán, Argentina) Propolis. *J. Ethnopharmacol*; 68: 97-102.

43. Park Y., Alencar S., Aguiar C. 2002. Botanical Origin and Chemicals Composition of Brazilian Propolis. *J. Agric. Food Chem*; 50:2502-2506.
44. Pérez Y., Cruz G., Licea J., Et al. (2008). Determinación del Efecto Inhibitorio de Tres Extractos Naturales: *Caléndula officinallis*, *Echinacea purpúrea* e *Hippocratea excelsa*, (Solos y Combinados) en Bacterias Aisladas de Casos de Mastitis Bovina. UNAM. FES-C. Edo. de México, Cuautitlán Izcalli. Págs.162-163.
45. Senedese J., Rodrigues A., Furtado M., Et al. 2008. Assessment Of the Mutagenic Activity of Extracts of Brazilian Propolis in Topical Pharmaceutical Formulations on Mammalian Cells In Vitro and In Vivo. *Evid Based Complement Alternat Med*; 49:1-7.
46. Shiva R., Martín C. C. 2007. Estudio de la Actividad Antimicrobiana de Extractos Naturales y Ácidos Orgánicos. Posible Alternativa a los Antibióticos Promotores de Crecimiento. Facultad de Veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona, España.
47. Texeira E., Message D., Negri G., Et al. 2008. Seasonal Variation, Chemical Composition and Antioxidant activity of Brazilian Propolis Samples. *Evid Based Complement Alternat Med* 2008; 177:1-9.
48. Tolosa L., Cañizares E. 2002. The Collection, Characterisation and Evaluation of Antimicrobial Activity of Propolis Extracts from Campeche, Mexico. *Ars. Pharmaceutica*; 43:1-2; 187-204.
49. Vega S., Rincón, A. 2009. Frecuencia y Características de Infecciones Nosocomiales en la Unidad de Cuidados Intensivos del Hospital General de Querétaro SESEQ. Universidad Autónoma de Querétaro. Facultad de Medicina.
50. Zamudio N. 2001. Horizonte Agroalimentario, 2001. Difusión Técnica de la Estación Experimental Famailla. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Año 2, número 5, septiembre. Pp. 24.
51. (<http://www.cienciadigital.es/hemeroteca/reportaje.php?id=26>)
52. (<http://www.update-software.com/abstractses/AB003543-ES.htm>)

53. (http://www.elhospitalblog.com/mambo/index.php?option=com_content&task=view&id=265&Itemid=48).
54. (Martin Paul.[on line].París. Etat de la Listériose Humaine en 2000 Selon les Données du CNR.2001, [http:// www.pasteur.fr/ externe](http://www.pasteur.fr/externe) [consulta: 17/4/02].)
55. (http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lia/garcia_r_mi/capitulo4.pdf).
56. (<http://www.fitoterapia.net/vademecum/laboratorios/Fitonoticias%20Echinacea%20Propolis.pdf>)