



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

Evaluación antibacteriana de propóleos mexicanos contra
cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y
Pseudomonas aeruginosa provenientes de muestras
clínicas.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Licenciada en Bioquímica Diagnóstica

P R E S E N T A:

Godoy Flores Ana Lilia

Asesor: M. en C. Betsabé Rodríguez Pérez
Coasesor: Dr. Tonatíuh Alejandro Cruz Sánchez



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis.

Evaluación antibacteriana de propóleos mexicanos contra cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* provenientes de muestras clínicas.

Que presenta la pasante: Ana Lilia Godoy Flores
Con número de cuenta: 308040816 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 27 de Noviembre de 2018.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Q. Mario Arturo Morales Delgado	
VOCAL	Q.F.B. Ladislao Palomar Morales	
SECRETARIO	M. en C. Betsabé Rodríguez Pérez	
1er. SUPLENTE	Q.F.B. Leticia Cubillo Carrillo	
2do. SUPLENTE	Q.F.B. Alma Susana García Barrón	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/cga*

Este trabajo fue realizado en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campo 4, en las instalaciones del Laboratorio 6 de Microbiología de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria (UIM) a cargo del Dr. Tonatiuh A. Cruz Sánchez.



AGRADECIMIENTOS.

A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, a sus aulas y laboratorios en donde viví las experiencias más gratificantes y también las más duras. En donde conocí a varias de las personas que hoy son parte fundamental de mi vida. Por todas las experiencias vividas, los logros y las lecciones aprendidas.

A todos los profesores que participaron directa e indirectamente compartiendo sus conocimientos y experiencias durante la carrera, pues fueron parte fundamental de este logro.

Al Doctor Tonatiuh Cruz Sánchez, por abrirme las puertas de su equipo y dejarme formar parte de su proyecto, por la paciencia y la confianza depositada en mí.

A la Maestra Betsabé Rodríguez, por creer en mí, por la paciencia, los conocimientos compartidos durante la carrera, el servicio social y la realización de esta tesis, por alentarme a seguir, por el tiempo trabajando juntas, por la comprensión, por esperarme, por la orientación y la amistad. La admiro como profesionalista y la quiero como amiga.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, que me dio todo y me abrió sus puertas para formarme como profesionalista. Es un honor y un privilegio formar parte de la matrícula de la mejor universidad del país. A donde sea que vaya dejaré en alto el nombre de nuestra máxima casa de estudios.

“Por mi Raza Hablará el Espíritu”

DEDICATORIAS.

A mis padres.

Gracias por el esfuerzo y la dedicación para proporcionarme todos los medios a su alcance para convertirme en una profesionalista, por promover y alentar mis sueños, por la confianza y las expectativas depositadas en mí, esto es por y para ustedes. Gracias mamá por todo el amor, los consejos y la paciencia, te admiro y te agradezco lo que soy. Gracias papá por todo el apoyo.

A mi abuelo.

Aunque que ya no pudo estar físicamente para verme completar este sueño, sin embargo, siempre creyó en mis capacidades y siempre estuvo orgulloso de mí, siempre estuvo alentándome a ser más grande, a seguir y conseguir todo lo que me propongo. Te amo y éste logro también es tuyo.

A Faby.

Por escuchar con entusiasmo lo que me apasionaba de lo aprendido día con día en la carrera, por ayudarme a estudiar, por alegrarte en las victorias y alentarme en las derrotas de este trayecto. Te amo y siempre voy a estar para ti, ánimo ya falta poco.

A Emi y Bruni.

Por ayudarme a estudiar, por asombrarse de lo preciosos y terroríficos que pueden ser los microbios, por las veces que hacíamos tarea juntos. Por memorizar conmigo. Los veo de este lado, los amo y los apoyaré como ustedes hicieron conmigo.

A Heber.

Gracias por estar a mi lado durante todo este viaje, gracias por la motivación y por creer en mí, por el tiempo, la paciencia, el amor, por ser mi compañero de carrera y de vida, por tomar mi mano y ser mi apoyo en los momentos difíciles, te amo y agradezco al destino por haberte puesto en mi camino. “Que la vida nos siga viendo crecer, tomados de la mano”.

ÍNDICE GENERAL.

ÍNDICE DE FIGURAS.....	VII
ÍNDICE DE TABLAS.....	IX
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	IX
ABREVIATURAS.....	X
1. RESUMEN.....	1
2. MARCO TEÓRICO	
2.1 EL PROPOLEO.....	2
2.1.1 Generalidades	2
2.1.2 Antecedentes históricos	2
2.1.3 Características físicas del propóleo.....	4
2.1.4 Composición química del propóleo.....	4
2.1.5 Metabolitos secundarios	11
2.1.6 Propiedades biológicas	14
2.1.7 Determinación de la calidad	16
2.2 BACTERIAS FARMACORRESISTENTES.....	17
2.2.1 Clasificación de los antibióticos.....	18
2.2.2 Importancia clínica de los microorganismos ESKAPE.....	19
2.2.3 <i>Escherichia coli</i> , importancia clínica.....	23
3. OBJETIVOS.....	24
3.1 Objetivo General.....	24
3.2 Objetivos Particulares.....	24
4. HIPÓTESIS.....	24
5. JUSTIFICACIÓN.....	25
6. METODOLOGÍA.....	26
6.1 Diagrama Experimental.....	26
6.2 Obtención del Extracto Etanólico de Propóleo (EEP).....	27
6.3 Pruebas cualitativas.....	27
6.3.1 Determinación cualitativa de fenoles totales.....	27
6.3.2 Determinación cualitativa de flavonoides.....	27
6.4 Pruebas cuantitativas.....	27
6.4.1 Cuantificación de compuestos fenólicos.....	27
6.4.2 Cuantificación de flavonoides	28
6.5 Prueba de sensibilidad bacteriana (Antibiograma).....	28

6.6 Prueba de difusión en agar	28
6.7 Determinación de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB) por el método de microdilución en caldo	28
7. RESULTADOS Y ANÁLISIS.....	29
7.1 Pruebas cualitativas.....	30
7.1.1 Determinación cualitativa de fenoles totales.....	30
7.1.2 Determinación cualitativa de flavonoides.....	31
7.2 Pruebas cuantitativas.....	31
7.2.1 Cuantificación de compuestos fenólicos.....	31
7.2.2 Cuantificación de flavonoides.....	32
7.3 Prueba de sensibilidad bacteriana (Antibiograma).....	34
7.4 Prueba de difusión en agar.....	39
7.5 Determinación de la CMI y CMB.....	40
8. CONCLUSIONES.....	44
9. PERSPECTIVAS.....	45
10. ANEXOS.....	46
ANEXO 1. DETERMINACIÓN CUALITATIVA FENOLES TOTALES	46
ANEXO 2. DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE FLAVONOIDES.....	46
ANEXO 3. CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS.....	47
ANEXO 4. CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES.....	50
ANEXO 5. PRUEBA DE SENSIBILIDAD BACTERIANA (ANTIBIOGRAMA).....	52
ANEXO 6. PRUEBA DE DIFUSIÓN EN AGAR.....	53
ANEXO 7. MICRODILUCIÓN EN CALDO PARA CMI Y CMB.....	55
ANEXO 8. RESULTADO SISTEMA VITEK 2 PARA <i>Staphylococcus aureus</i> (1)	58
ANEXO 9. RESULTADO SISTEMA VITEK 2 PARA <i>Staphylococcus aureus</i> (2)	59
ANEXO 10. RESULTADO SISTEMA VITEK 2 PARA <i>Staphylococcus aureus</i> (3)	60
ANEXO 11. RESULTADO SISTEMA VITEK 2 PARA <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	61
ANEXO 12. RESULTADO SISTEMA VITEK 2 PARA <i>Escherichia coli</i>	62

ANEXO 13. ANEXO 13. INSERTO Multidiscos Combinados: 71080380 de papel filtro para el estudio in vitro de sensibilidad bacteriana BIO-RAD.....63

11. REFERENCIAS.....64

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1. Tonalidades de varias muestras de propóleo en greña 4

Figura 2. Elementos básicos del metabolismo primario y relación con el metabolismo secundario de las plantas..... 11

Figura 3. Ejemplos de estructuras de compuestos fenólicos..... 13

Figura 4. Flavonoides. Estructura básica y tipos..... 14

Figura 5. Blancos de distintos grupos de antibióticos..... 19

Figura 6. Frotis de sangre periférica que muestra cocos en pares..... 20

Figura 7. “*Staphylococcus aureus*”. Morfología microscópica. 20

Figura 8. Cápsula translúcida de *Klebsiella pneumoniae* en una tinción de Gram, usando un microscopio de contraste de fases. 21

Figura 9. “*Acinetobacter baumannii*”, oportunista asociado con infecciones intrahospitalarias. 21

Figura 10. “*Pseudomonas aeruginosa*” es la especie patógena más frecuente en humanos. 22

Figura 11. “*Enterobacter cloacae*”..... 22

Figura 12. “*Escherichia coli*”. Especie bacteriana más común de la microbiota intestinal 23

Figura 13. Prueba cualitativa de fenoles totales. 31

Figura 14. Prueba cualitativa de flavonoides.....31

Figura 15. Resultados de Prueba de Sensibilidad bacteriana para cepa de *Staphylococcus aureus* (1)..... 35

Figura 16. Resultados de Prueba de Sensibilidad bacteriana para cepa de *Staphylococcus aureus* (2)..... 35

Figura 17. Resultados de Prueba de Sensibilidad bacteriana para cepa de *Staphylococcus aureus* (3)..... 35

Figura 18. Resultados de Prueba de Sensibilidad bacteriana para cepa de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	36
Figura 19. Resultados de Prueba de Sensibilidad bacteriana para cepa de <i>Escherichia coli</i>	36
Figura 20. Prueba de difusión en agar, <i>Staphylococcus aureus</i> (2)	39
Figura 21. Reacción de reducción de una sal de tetrazolio	40
Figura 22. Determinación de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), por microtécnica de dilución en caldo	41
Figura 23. Determinación de Concentración Mínima Bactericida (CMB), por microtécnica de dilución en caldo	42
Figura 24. CMI [0.031 mg/mL] EEP Morelos	43
Figura 25. CMB [0.062 mg/mL] EEP Morelos	43
Figura 26. CMI [0.062 mg/mL] EEP Morelos	43
Figura 27. CMB [0.125 mg/mL] EEP Morelos	43
Figura 28. Reacción de óxido-reducción del ácido gálico	47
Figura 29. Sistemas para la elaboración de la curva de ácido gálico	48
Figura 30. Curva para la cuantificación de compuestos fenólicos.....	48
Figura 31. Reacción de quelación del ion Al^{3+} con la quercetina	50
Figura 32. Curva para cuantificación de flavonoides.....	51
Figura 33. Microplaca de ELISA de 96 pocillos. Técnica de diluciones dobles para determinación de CMI y CMB.....	56

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Estructuras químicas de algunos de los compuestos identificados en los propóleos.....	6
Tabla 2. Principales actividades biológicas y componentes de propóleos en el mundo.....	15
Tabla 3. Clasificación de los antibióticos y mecanismo de acción.....	18
Tabla 4. Grupo E.S.K.A.P.E. Características, importancia clínica y resistencia..	20
Tabla 5. Cuantificación de compuestos fenólicos	32
Tabla 6. Cuantificación de flavonoides en extractos etanólicos	33
Tabla 7. Prueba de Sensibilidad Bacteriana (Antibiograma)	34
Tabla 8. Clasificación de cepas aisladas. Perfil de Resistencia.....	37
Tabla 9. Efecto de los extractos de propóleo frente a la cepa de <i>Staphylococcus aureus</i> (2), por la técnica de microdilución en caldo.....	41
Tabla 10. Preparación de la curva de calibración para la cuantificación de compuestos fenólicos	47
Tabla 11. Preparación de la curva de calibración para cuantificación de flavonoides.	50

ÍNDICE DE GRÁFICOS.

Gráfico 1. Determinación cuantitativa de compuestos fenólicos.....	32
Gráfico 2. Determinación cuantitativa de flavonoides.....	33

ABREVIATURAS.

BLEE	Betalactamasas de Espectro Extendido
°C	Grados Celsius
CAPE	Fenetil éster del ácido caféico
CDCP	Center for Disease Control and Prevention
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute
CMB	Concentración Mínima Bactericida
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
DNA	Deoxyribonucleic acid
ECDC	European Centre for Disease prevention Control
EEP	Extracto Etanólico de Propóleo
EPEC	<i>Escherichia coli</i> Enteropatógena
ESKAPE	<i>Enterococcus faecium, Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae, Acinetobacter baumannii, Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Enterobacter spp</i>
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FeCl ₃	Cloruro férrico
FESC	Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán
FDA	United States Food and Drug Administration
InDRE	Instituto de Referencia Epidemiológica
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
IL-2	Interleucina 2
IL-2R	Receptor de Interleucina 2
MDR	Multidrug-resistant pathogens
mg	Miligramo
mL	Mililitro
µg	Microgramo
µL	Microlitro
NF-kB	Factor Nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NK	Natural Killer
NOM	Norma Oficial Mexicana
nm	Nanómetro
PDR	Pandrug Resistant
ppm	Partes por millón
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
VIH-1	Virus de Inmunodeficiencia Humana Tipo 1
XDR	Extensive Drug Resistance

1. RESUMEN.

El propóleo es una mezcla compleja elaborado a partir de resinas, bálsamos y otras exudaciones de las plantas que las abejas *Apis mellifera* recogen y modifican, para utilizarlo como material de construcción en las colmenas, para evitar la proliferación de microorganismos patógenos.

Contiene constituyentes farmacológicamente activos que le atribuyen actividades biológicas como antiinflamatorio, antioxidante, inmunomodulador o antibacteriano. La actividad antibacteriana se atribuye principalmente a la presencia de flavonoides y derivados del ácido caféico. En los últimos años, la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán ha realizado múltiples investigaciones acerca de las propiedades antimicrobianas y antifúngicas del propóleo, que demuestran la efectividad *in vitro* de sus activos farmacológicos, sobre un gran número de patógenos humanos y veterinarios, para su posible utilización como tratamiento alternativo contra diversas enfermedades infecciosas.

En el presente estudio, se estudiaron tres extractos de propóleos de diferentes estados de la República Mexicana: Estado de México, Hidalgo y Morelos. Se cuantificaron los compuestos fenólicos y flavonoides, así como la actividad antimicrobiana frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* de aislamientos clínicos por el método de difusión en disco.

La Norma Mexicana Oficial “*Propóleos, producción y especificaciones para su procesamiento*”, NOM-003-SAG/GAN-2017, establece como concentraciones mínimas de fenoles totales y flavonoides 5 % y 0.5 % respectivamente; los tres propóleos evaluados cumple la normatividad.

El propóleo de Hidalgo presentó concentraciones superiores de los metabolitos bioactivos (54.1 % de fenoles totales y 3.05 % de flavonoides). Las cepas bacterianas evaluadas provenían de muestras clínicas y demostraron resistencia a distintos antimicrobianos. La cepa de *S. aureus* (2), fue la única que demostró sensibilidad a los extractos de los propóleos de Hidalgo y Morelos. Los resultados de la evaluación antimicrobiana demostraron que los propóleos con mayor concentración de fenoles totales y de flavonoides tienen mayor actividad antimicrobiana.

La resistencia bacteriana a los antibióticos se encuentra en constante evolución y debido a la efectividad de sus metabolitos bioactivos, el propóleo debe ser contemplado e investigado para su utilización como tratamiento complementario, pues la actividad de sus componentes puede desencadenar un efecto sinérgico o potencializador de los antibióticos utilizados en los tratamientos convencionales.

2. MARCO TEÓRICO.

2.1 EL PRÓPOLEO.

2.1.1 Generalidades.

La medicina tradicional es reconocida hoy como un recurso fundamental para la salud de millones de seres humanos, un componente esencial del patrimonio tangible e intangible de las culturas del mundo, un acervo de información, recursos, prácticas para el desarrollo y el bienestar, además de un factor de identidad de numerosos pueblos del planeta (Biblioteca Digital de las Plantas Medicinales de México, 2012).

En las últimas décadas, han sido publicados varios estudios relacionados con la composición de productos apícolas (miel, polen, jalea real y propóleos) y sus propiedades biológicas, lo cual genera la atención de investigadores.

La palabra propóleo se deriva del griego *pro* (en defensa de o delante de) y *polis* (ciudad), es decir, en defensa de la ciudad, designando a la sustancia que recubre la colmena de las abejas *Apis mellifera* cumpliendo funciones de defensa (Palomino *et al*, 2009). De ahí pasó al latín (*propolis*) con el significado de tapar o alisar. En español, es denominado propóleo o propóleos (Asis, 2001).

El propóleo es un producto de la colmena formado por resinas que las abejas recolectan de ciertas plantas, en particular de flores y brotes de hojas, las cuales mezclan con saliva, enzimas y otras secreciones propias de las abejas (Farré *et al.*, 2004). Es usado como un protector natural contra organismos patógenos y hongos; protege contra el frío durante el invierno y actúa como material de sellado en las paredes externas e internas de la colmena para reducir la entrada de insectos (Marcucci *et al.*, 2001; Papotti *et al.*, 2012). Este producto es muy apreciado por sus diversas actividades biológicas (Salatino *et al.*, 2011).

Estudios han revelado la presencia de ceras, resinas, bálsamos, aceites esenciales, polen, impurezas mecánicas, compuestos fenólicos, aldehídos, cetonas y ésteres alifáticos, aminoácidos y ésteres aromáticos, flavonoides, flavonas, flavononas, ácidos grasos, terpenoides, esteroides y azúcares. La proporción de cada componente es variable. (Chaillou *et al.*, 2004; León, 2012; Guerrero, 2013). Las características individuales de cada propóleo están estrechamente relacionadas con la especie de abeja recolectora, la composición química, el origen botánico y la época de recolección.

2.1.2 Antecedentes históricos.

El propóleo es tan antiguo como la miel y ha sido utilizado por el hombre desde hace siglos. Existen registros que indican el uso del mismo por los antiguos egipcios, persas y romanos. En el siglo pasado los científicos fueron capaces de demostrar que el propóleo posee importantes actividades biológicas. La

investigación sobre la composición química del propóleo se inició a principios del siglo XX y se continuó después de la Segunda Guerra Mundial. Los avances en los métodos analíticos cromatográficos permitieron la separación y la extracción de varios componentes del propóleo. Al menos 300 compuestos diferentes se han identificado hasta el momento (Kuropatnicki *et al.*, 2013).

Con el descubrimiento de la penicilina (1928) y el advenimiento de los modernos antibióticos, el propóleo comenzó a dejarse de lado y paradójicamente esa tendencia en la actualidad, ha comenzado a revertirse (Adanero, 2000).

En México, el cuidado y aprovechamiento de los productos de las abejas se remonta a épocas prehispánicas donde las diferentes culturas existentes tales como los Mayas, Tarascos, Lacandones y Olmecas Pupilucas cultivaban a las abejas sin aguijón (Meliponinos), con fines alimenticios, medicinales y religiosos (Martínez *et al.*, 2010).

Según los esquemas bajo los cuales los apicultores llevan a cabo su actividad en México, se identifican tres grupos: tecnificado, semitecnificado y tradicional. Dentro del primer grupo están los productores con más de 100 colmenas, que incorporan adelantos tecnológicos de vanguardia e incluso generan tecnología propia (innovación endógena) acorde a las características de su región; manejan una apicultura diversificada y practican la movilización de apiarios en búsqueda de floraciones o mejores espacios para colocar sus colmenas. La apicultura tecnificada se inició aproximadamente en el año 1920. El segundo grupo lo conforman apicultores con diferentes grados de tecnificación, y generalmente poseen entre 60 y 100 colmenas. Por último, el tercer grupo, dentro del cual se practica una apicultura como una actividad complementaria a otras labores o bien como un pasatiempo, no incorporan tecnología, y en la mayoría de los casos su técnica es rudimentaria (INEGI, 2009).

En los últimos 50 años se han realizado estudios científicos enfocados en determinar la composición química, propiedades curativas y el uso farmacológico de los preparados a base de propóleos. Esto ha permitido que su uso en fitomedicina se haya incrementado, por lo tanto, es una materia valiosa para la industria farmacéutica, de cosméticos y de alimentos (Guerrero, 2013).

Los usos de este producto natural se han mantenido durante siglos, hasta llegar a nuestros días, en que existe una cantidad importante de investigaciones científicas en los campos de la biología, la medicina humana y veterinaria. Sin embargo, se requiere de más investigación, que contribuya al conocimiento de los alcances reales del propóleo, las aplicaciones, las limitaciones etc., para contar con un producto estandarizado que no se limite a ser de uso empírico.

2.1.3 Características físicas del propóleo.

El propóleo en greña puede presentar tonalidades de color castaño, marrón, pardo, rojizo y verde, en algunos casos negro, según sea el origen botánico y geográfico (El Hady y Hegazi, 2002). A temperaturas elevadas es suave, flexible y muy pegajoso, pero cuando se enfría se vuelve duro y quebradizo. Con sabor acre o amargo, olor agradable y dulce (González, 1997; Kuropatnicki *et al.*, 2013). Este polímero balsámico resinoso de las abejas contiene fundamentalmente ceras y aceites esenciales, siendo una sustancia muy compleja, soluble en alcohol y en solventes como éter, acetona, benceno, tricloroetileno y otros (Salamanca y Correa, 2007; Gutiérrez, 2011).

Los compuestos identificados en propóleos de colmenas ubicadas en emplazamientos cercanos entre sí, no difieren significativamente, aunque desde el punto de vista cuantitativo, pueden ser variables. Ello implica que los propóleos deban ser estudiados en función de la zona geográfica de las colmenas (Gutiérrez, 2011).

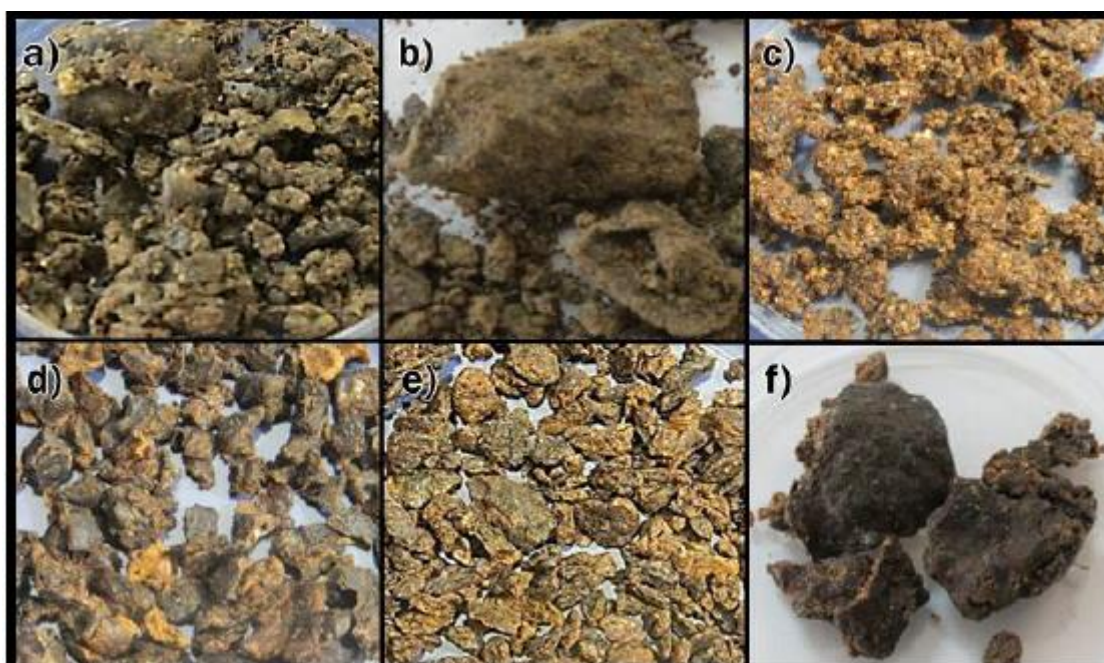


Figura 1. Tonalidades de varias muestras de propóleo en greña. a) Cuautitlán Izcalli, Estado de México. b) El Oro, Estado de México. c) Villa del Carbón, estado de México. d) Tianguismanalco, Puebla. e) San José Iturbide, Guanajuato. f) Tlalpujahua, Michoacán. Fuente: Rodríguez, 2015.

2.1.4 Composición química del propóleo.

El propóleo es un producto natural rico en constituyentes bioactivos. Su composición química es muy compleja y depende en gran medida a la flora correspondiente a las zonas donde es recolectado. Más de 300 compuestos han

sido identificados en muestras de propóleo en greña de diferentes orígenes (Salatino *et al.*, 2011).

El origen de la planta, el olor y el color, son los principales determinantes de la composición química y como consecuencia, de las propiedades biológicas del propóleo. El control de la procedencia geográfica es crucial para asegurar una composición coherente del propóleo y lograr la mejor estandarización posible (Bankova *et al.*, 2007; Sforcin y Bankova 2011).

En numerosos estudios se ha determinado que los constituyentes principales del propóleo son: cera, resinas, bálsamos, aceites esenciales, además de impurezas orgánicas e inorgánicas, denominadas genéricamente impurezas mecánicas (Ribeiro y Salvadori, 2003; Chaillou, 2005).

Además, se ha determinado que la variación y proporción en los componentes del propóleo se originan de varias fuentes: los exudados de las plantas de donde colectan las abejas, las sustancias secretadas por el metabolismo de las abejas y los materiales que se introducen dentro de la elaboración del propóleo (Farooqui *et al.*, 2012), la época de recolección, el origen vegetal de la resina y la raza de las abejas (Chaillou, 2005), principalmente.

Un análisis primario de cualquier muestra de propóleo, permitirá determinar, en líneas generales, la presencia de cera, íntimamente mezclada en proporciones de 20-30 %. Las muestras obtenidas por raspado de cuadros presentan mayores cantidades de cera, además de resinas y bálsamos aromáticos (40-50 %), aceites esenciales (5-10 %), polen (4-5 %) y materia no orgánica (10-30 %). Estas últimas se encuentran en los propóleos empleados con fines constructivos en la colmena (Chaillou, 2005; Papotti *et al.*, 2012). Químicamente se han identificado en el propóleo, aminoácidos, ácidos alifáticos, ácidos aromáticos y sus ésteres, alcoholes, aldehídos, agliconas, hidrocarburos, cetonas, terpenoides, vitaminas, minerales flavonoides, terpenos, sesquiterpenos, estilbenos, esteroides, aldehídos aromáticos, etc.

Los componentes principales son compuestos fenólicos que presentan en su estructura un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilo (Chaillou, 2005) y constituyen mezclas complejas que contienen compuestos representativos de diversos grupos estructurales, destacándose entre los mismos los flavonoides y las agliconas, a los cuales se les atribuye las propiedades antibacterianas, fungicidas, antivirales y antioxidantes, así como también los ácidos fenólicos y sus ésteres (Papotti *et al.*, 2012).

Algunos de los principales componentes químicos identificados en el propóleo por técnicas cromatográficas se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Estructuras químicas de algunos de los compuestos identificados en los propóleos. (Salatino *et al.*, 2005; Salatino *et al.*, 2011).

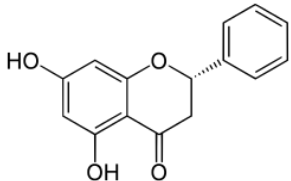
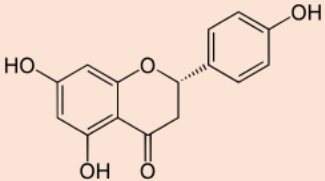
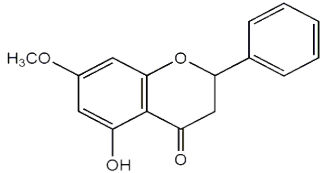
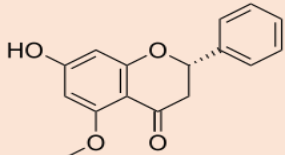
Nombre del compuesto	Estructura química	Actividad biológica	Referencia
Flavononas			
Pinocembrina		Antioxidante	Kumazawa <i>et al.</i> , 2004; Salatino <i>et al.</i> , 2005; Volpi y Bergonzini 2006; Falção <i>et al.</i> , 2010; Marghitas <i>et al.</i> , 2013; Kosalec <i>et al.</i> , 2007; Ahn, Kunimasa y Ohta, 2007; Shaheen <i>et al.</i> , 2011; Markham <i>et al.</i> , 1996
Naringenina		Antioxidante, antiinflamatorio, promotor de carbohidratos e inmunomodulador	Kosalec <i>et al.</i> , 2007; Volpi y Bergonzini 2006
Pinostrobin		Antioxidante	Markham <i>et al.</i> , 1996; Marghitas <i>et al.</i> , 2013
Alpinetina		Antioxidante	Luo <i>et al.</i> , 2013; Boisard <i>et al.</i> , 2014; Falção <i>et al.</i> , 2010

Tabla 1. Estructuras químicas de algunos de los compuestos identificados en los propóleos (Continuación...)

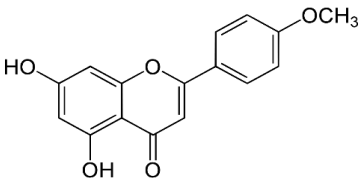
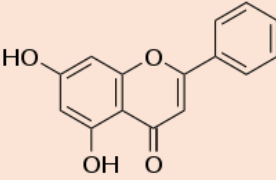
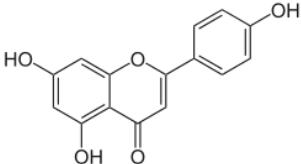
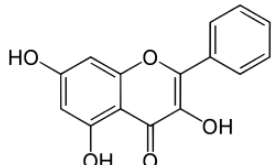
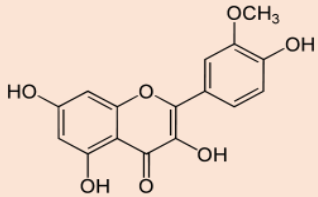
Nombre del compuesto	Estructura química	Actividad biológica	Referencia
FLAVONAS			
Acacetina		Antioxidante	Valencia <i>et al.</i> , 2012; Volpi y Bergonzini, 2006
Crisina		Antioxidante, antiinflamatorio, fitoestrógeno.	Valencia <i>et al.</i> , 2012 ; Kumazawa <i>et al.</i> , 2004; Bankova <i>et al.</i> , 2007 Piccinelli <i>et al.</i> , 2013; Falçao <i>et al.</i> , 2010; Marghitas <i>et al.</i> , 2013 Ahn <i>et al.</i> , 2007; Volpi y Bergonzini 2006; Popova <i>et al.</i> , 2007; Markham <i>et al.</i> , 1996
Apigenina		Acelera apoptosis, induce la autofagia.	Volpi y Bergonzini 2006; Piccinelli <i>et al.</i> , 2013; Falçao <i>et al.</i> , 2010; Lagouri <i>et al.</i> , 2014; Shaheen <i>et al.</i> , 2011
FLAVONOLES			
Galangina		Antioxidante, actividad antibacteriana, antiviral y anticancerígena.	Volpi y Bergonzini 2006; Shaheen <i>et al.</i> , 2011; Popova <i>et al.</i> , 2007 Lagouri <i>et al.</i> , 2014; Marghitas <i>et al.</i> , 2013; Ahn <i>et al.</i> , 2007; Kumazawa <i>et al.</i> , 2004; Kosalec <i>et al.</i> , 2007
Isorhamnetina		Antioxidante	Bankova <i>et al.</i> , 1983

Tabla 1. Estructuras químicas de algunos de los compuestos identificados en los propóleos (Continuación...)

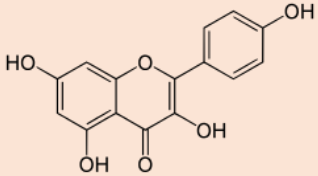
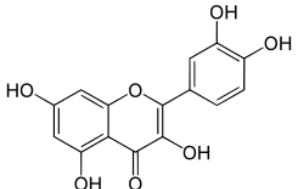
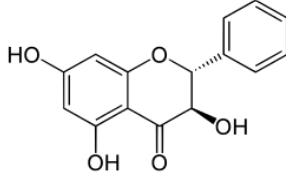
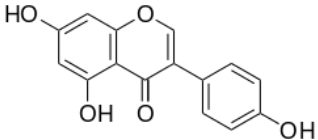
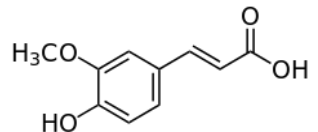
Nombre del compuesto	Estructura química	Actividad biológica	Referencia
Kaempferol		Antioxidante, anticancerígeno y antidepresivo	Volpi y Bergonzini 2006; Piccinelli <i>et al.</i> , 2013; Bankova <i>et al.</i> , 1983
Quercetina		Inhibidor de la producción de células adiposas,	Bankova <i>et al.</i> , 1983; Lagouri <i>et al.</i> , 2014
BIOFLAVONOIDES			
Pinobanksina		Antioxidante	Ahn <i>et al.</i> , 2007; Piccinelli <i>et al.</i> , 2013; Kumazawa <i>et al.</i> , 2004; Falção <i>et al.</i> , 2010; Popova <i>et al.</i> , 2007; Markham <i>et al.</i> , 1996
ISOFLAVONOIDES			
Genisteína		Antioxidante	Volpi y Bergonzini, 2006
ÁCIDOS FENÓLICOS Y ÉSTERES			
Ácido ferúlico		Antioxidante y antiinflamatorio	Popova <i>et al.</i> , 2007; Kumazawa <i>et al.</i> , 2004; Marghitas <i>et al.</i> , 2013; Lagouri <i>et al.</i> , 2014; Ahn <i>et al.</i> , 2007 Banskota <i>et al.</i> , 2002

Tabla 1. Estructuras químicas de algunos de los compuestos identificados en los propóleos (Continuación...)

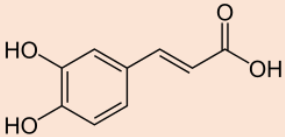
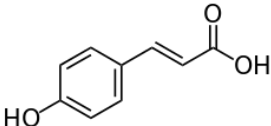
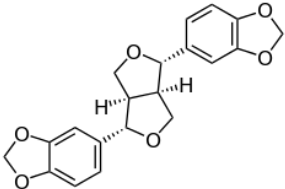
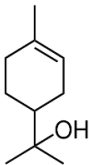
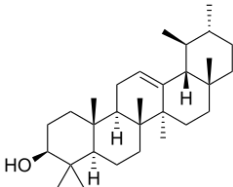
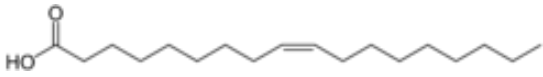

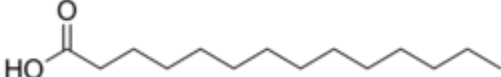
Nombre del compuesto	Estructura química	Actividad biológica	Referencia bibliográfica
Ácido caféico		Antioxidante, anticancerígeno	Popova <i>et al.</i> , 2007; Lagouri <i>et al.</i> , 2014; Kumazawa <i>et al.</i> , 2004; Falção <i>et al.</i> , 2010; Marghitas <i>et al.</i> , 2013; Ahn <i>et al.</i> , 2007
Ácido p-cumárico		Antioxidante	Popova <i>et al.</i> , 2007; Lagouri <i>et al.</i> , 2014; Falção <i>et al.</i> , 2010; Marghitas <i>et al.</i> , 2013; Ahn <i>et al.</i> , 2007; Kumazawa <i>et al.</i> , 2004
LIGNANOS			
Sesamina		Antioxidante	Christov <i>et al.</i> , 1999
MONOTERPENOS			
Terpineol		Antioxidante	Koo <i>et al.</i> , 2002
TRITERPENOS			
β-amirina		Antioxidante	Christov <i>et al.</i> , 1999

Tabla 1. Estructuras químicas de algunos de los compuestos encontrados en el propóleo (Continuación...)

Nombre del compuesto	Estructura química	Actividad biológica	Referencia bibliográfica
ÁCIDOS GRASOS			
Ácido oleico		Participa en la disminución de lipoproteínas de alta densidad, hipotensor e inmunomodulador.	Chang <i>et al.</i> , 2003
Ácido palmítico		Principal ácido graso saturado de la dieta.	
Ácido mirístico		Ácido graso saturado	

2.1.5 Metabolitos secundarios.

El estudio de estos compuestos se inició por los químicos orgánicos del siglo XIX y principios del XX, quienes los llamaron “productos naturales”, debido a su importancia como drogas, venenos, saborizantes y materiales industriales. De acuerdo con los biólogos evolucionistas, las defensas vegetales deben haber surgido a través de los fenómenos de mutación hereditaria, selección natural y cambios evolutivos en las rutas metabólicas básicas (Zeiger, 2006).

Los metabolitos secundarios son químicamente reactivos (aptos para ingresar a los sistemas vivos, interactuar y cambiar la estructura de un receptor o blanco molecular y penetrar en la célula donde puede afectar varios procesos fisiológicos). De allí deriva su actividad biológica o farmacológica (Anaya y Espinosa., 2006). Entre éstos se encuentran: fenoles, flavonoides, taninos, cumarinas, terpenoides, esteroides, alcaloides y otros compuestos.

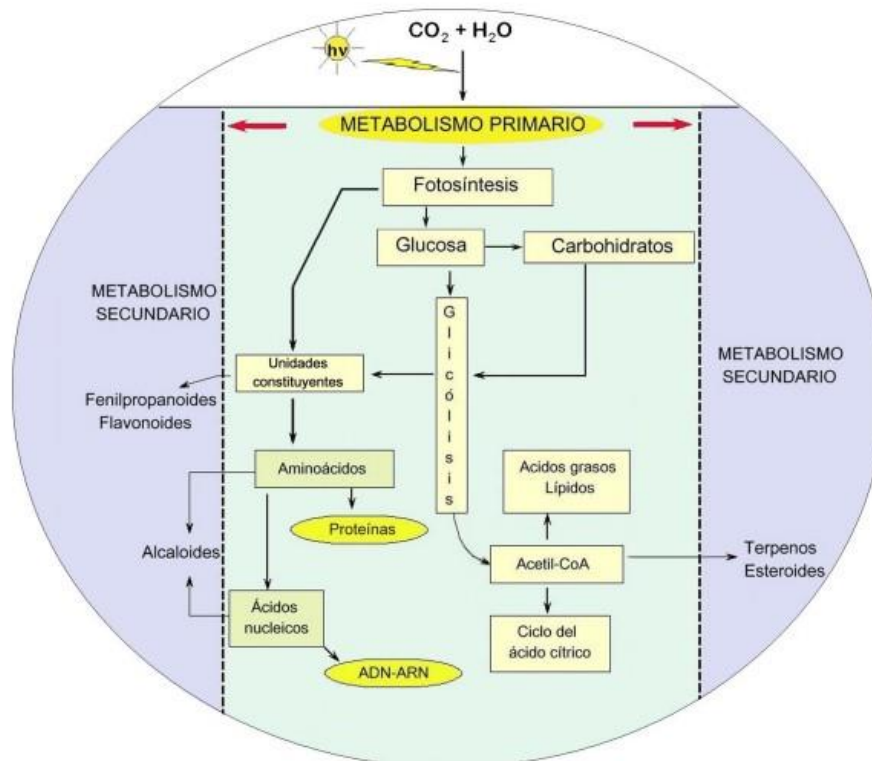


Figura 2. Elementos básicos del metabolismo primario y relación con el metabolismo secundario de las plantas.

Fuente: García y Pérez- Urria, 2009.

El propóleo en greña, proviene de una mezcla de sustancias resinosas recogidas de los vegetales, en las que se encuentran estos metabolitos secundarios, sustancias procedentes de regurgitaciones glandulares segregadas por las abejas, y de ceras y polen (Jean Prost y Le Conte, 2007).

La naturaleza de dos de los principales componentes del propóleo, provenientes del metabolismo secundario de las plantas, a los cuales se les han atribuido la mayoría de las propiedades terapéuticas se describe a continuación.

a) Fenoles.

Son compuestos con un grupo hidroxilo unido a un anillo de benceno (también llamado hidroxibenceno o ácido carbólico).

Los compuestos fenólicos son unos de los principales metabolitos secundarios de las plantas y su presencia en el reino animal se debe a la ingestión de éstas. Los fenoles son sintetizados de *novo* por las plantas y son regulados genéticamente, tanto a nivel cualitativo como cuantitativo, aunque a este nivel también existen factores ambientales. Además, actúan como fitoalexinas (las plantas heridas secretan fenoles para defenderse de posibles ataques fúngicos o bacterianos) y contribuyen a la pigmentación de muchas partes de la planta (Gimeno, 2004).

Los polifenoles se pueden clasificar debido a su diversidad estructural (fig. 3). Según su estructura química tenemos 2 grandes grupos:

1.No flavonoides.

Entre ellos:

- Fenoles no carboxílicos
- Ácidos fenólicos: derivados del ácido benzoico y derivados del ácido cinámico.

2.Flavonoides (C6-C3-C6).

Formados por 2 grupos bencénicos unidos por un puente tricarbonado. Subgrupos:

- Antocianos.
- Flavonas, flavononas, flavanoles y flavanonoles.
- Flavanoles, taninos condensados y lignanos (Gimeno, 2004).

Lo más destacable de los compuestos fenólicos son sus propiedades antioxidantes. Por un lado, son muy susceptibles a ser oxidados y por otro, impiden que los metales catalicen las reacciones de oxidación. Así, los grupos hidroxilo, al estar unidos a un anillo bencénico, presentan la posibilidad de que el doblete del átomo de oxígeno interaccione con los electrones del anillo, lo que les confiere unas características especiales respecto al resto de alcoholes.

Por otro lado, pueden actuar de quelantes (principalmente los fenoles no flavonoides) y formar complejos con metales di o trivalentes, especialmente con el hierro y el aluminio, lo que puede tener también implicaciones nutricionales (Gimeno, 2004).

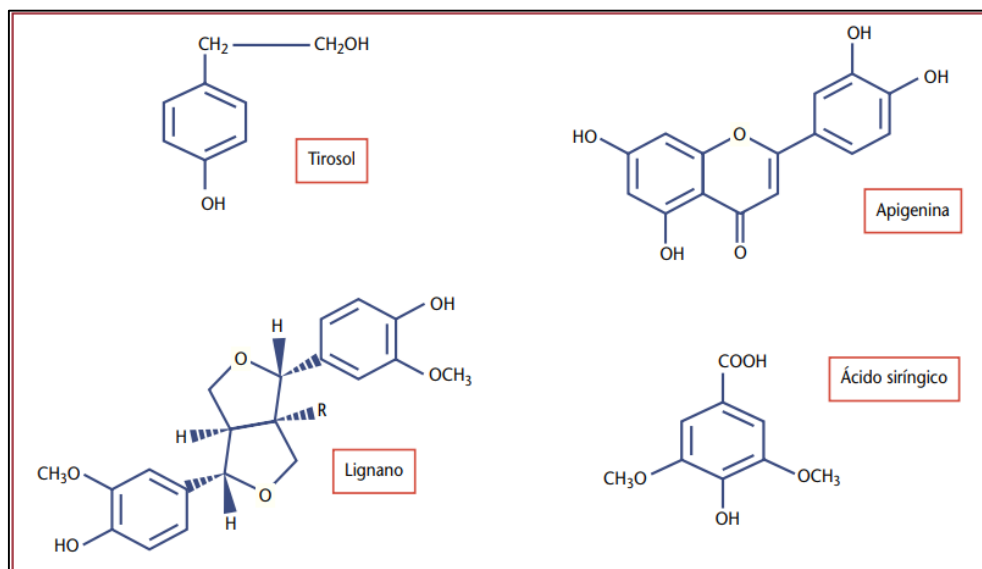


Figura 3. Ejemplos de estructuras de compuestos fenólicos.

Fuente: Gimeno, 2004.

b) Flavonoides.

Los flavonoides son pigmentos naturales presentes en los vegetales y que protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioletas, la polución ambiental, sustancias químicas presentes en los alimentos, entre otros. Son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenilpiranos (C6-C3-C6), compuesto por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico) (Martínez *et al.*, 2002).

La actividad de los flavonoides como antioxidantes depende de las propiedades redox de sus grupos hidroxifenólicos y de la relación estructural entre las diferentes partes de la estructura química.

El creciente interés en los flavonoides se debe a la apreciación de su amplia actividad farmacológica. Pueden unirse a los polímeros biológicos, tales como enzimas, transportadores de hormonas, y ADN; quelar iones metálicos transitorios, tales como Fe²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, catalizar el transporte de electrones y depurar radicales libres. Debido a este hecho, se han descrito efectos protectores en patologías tales como diabetes mellitus, cáncer, cardiopatías, infecciones víricas, úlcera estomacal y duodenal e inflamaciones. Otras actividades que merecen ser destacadas son sus acciones antivirales y antialérgicas, así como sus propiedades antitrombótica y antiinflamatoria (Martínez *et al.*, 2002). Algunos ejemplos se muestran en la figura 4.

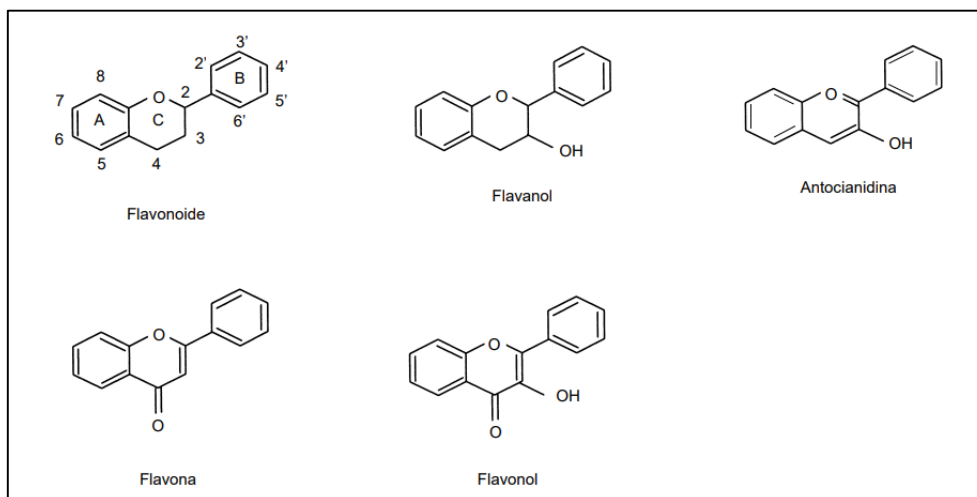


Figura 4. Flavonoides. Estructura básica y tipos.

Fuente: Martínez *et al.*, 2002.

2.1.6 Propiedades biológicas.

Las propiedades biológicas del propóleo dependen de la calidad de éste, así como de las proporciones de sus constituyentes y el sinergismo entre éstos.

Sus propiedades son variables según su origen botánico y geográfico, pudiendo así mencionar propiedades antisépticas, cicatrizantes, antiinflamatorias, anestésicas, así como su actividad antiviral, bacteriostática y bactericida, antifúngica, entre otras (Gutiérrez, 2011).

El propóleo es el producto de abeja con la mayor actividad antimicrobiana, la cual ha sido confirmada por numerosos estudios científicos, se ha demostrado su actividad en contra de múltiples microorganismos tales como: *Bacillus cereus*, *Mycobacterium sp.*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus viridans*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Aspergillus sp.*, *Cryptococcus neoformans* y *Proteus vulgaris* (Estrada, 2012).

Se muestran en la tabla 2, las principales actividades del propóleo de acuerdo a investigaciones a nivel mundial, considerando los países de mayor producción de propóleo.

Tabla 2. Principales actividades biológicas y componentes de propóleos en el mundo. (Marcucci, 1995; FAO, 2007; Sforcin y Bankova; 2011; Bogdanov, 2012).

Actividad	Propóleos				Microorganismos sobre el que actúan/ Acción
	Europa	Brasil	Cuba	México	
Anti bacteriana	Flavononas, flavonas, ácidos fenólicos y sus ésteres	Ácido p-cumárico prenilado, diterpenos	Benzofenonas preniladas	CAPE** **Fenetil éster del ácido caféico	<i>Bacillus larvae</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>M. tuberculosis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. sobrinus</i> , <i>S. mutans</i> , <i>S. cricetus</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> , <i>Bacteroides nodosus</i> , <i>K. pneumoniae</i>
Antifúngica y antiviral	Flavonoides	Prenilados y benzopironas	Isoflavonoides	Pinocebrina	<i>C. albicans</i> , <i>C. neoformans</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>M. canis</i> , <i>Alternaria alternata</i> , <i>Fusarium sp.</i> VIH-1, virus de Ajuesky, herpes simple tipo 1 y 2.
Antiparasitaria	No evaluado	CAPE	No evaluado	CAPE	<i>Giardia lamblia</i> , <i>Trichomonas vaginalis</i> , <i>Eimeria magna</i>
Antiinflamatoria	Flavononas, flavonas, ácidos fenólicos y sus ésteres	No evaluado	No evaluado	CAPE	Supresión de la síntesis de DNA para células mononucleares y células T. CAPE: efectos inhibidores en la transcripción de factores NF-kB, en la transcripción del gen para IL-2, en la expresión del gen para IL-2R y la proliferación de células T. La acción moduladora en macrófagos, estimulación lítica de células NK contra células tumorales, aumento de citoquinas proinflamatorias, expresión y la producción de linfocitos Th1 y Th2.
Anticancerígena	CAPE	Ácido p-cumárico prenilado, diterpenos, benzofuranos.	Benzofenonas preniladas	CAPE, xanthomicrol, galangina, acacentina, crisina	
Antiproliferativa (inhibe la reproducción celular)	Galangina, flavonoides y ácido cinámico	No evaluado	No evaluado	Pinocebrina, crisina	
Antioxidante	Flavonoides, ácidos fenólicos y sus ésteres	Ácido p-cumárico prenilados, flavonoides	No evaluado	Rutina, CAPE, galangina	Acción comparable a la Vitamina E, minimizando la peroxidación lipídica y el efecto de los radicales libres.
Cicatrizante	No evaluado	No evaluado	Flavononas (glucósidos), metoxiflavonoides	No evaluado	Intervención a nivel de mediadores de la inflamación.

2.1.7 Determinación de la calidad.

La calidad del propóleo está directamente relacionada con los métodos de recolección, almacenamiento y conservación. En ese sentido la calidad depende del tipo de flora, características ambientales (trabajo del apicultor), almacenamiento y conservación, lugar de procedencia, región de la colmena donde se extrajo y método de recolección utilizado.

Para que la calidad de un propóleo se considere óptima, debe cumplir, a grandes rasgos, los siguientes requisitos:

- Estar libre de contaminantes tóxicos.
- Contener bajos porcentajes de cera, materia insoluble y cenizas.
- Definir su procedencia botánica, para determinar el tipo de compuestos activos.
- Tener contenidos elevados de metabolitos secundarios como compuestos fenólicos y flavonoides.

El contenido de fenoles y flavonoides es un parámetro que establece tanto la calidad del material como su potencial biológico. Si el propóleo se conserva más de un año, su actividad biológica comienza a decrecer, es por ello que se recomienda mantenerlos en frascos ámbar de vidrio hasta su utilización, pero existe una variación de la cantidad de compuestos biológicamente activos ya que están en función de la zona geográfica donde se encuentran las colmenas, la vegetación, la época del año, entre otros (Rodríguez, 2015).

La producción de propóleos en México es muy limitada. En octubre de 2017, se publicó en el Diario Oficial de la Federación la primera “Norma Oficial Mexicana NOM-003-SAG/GAN-2017, Propóleos, producción y especificaciones para su procesamiento”, con la finalidad de conseguir la inserción, posicionamiento y consolidación del propóleo mexicano en el mercado.

Dentro de este marco normativo se mencionan los métodos de prueba, así como propiedades físicas, químicas y antimicrobianas que los propóleos deben presentar para considerarse un producto con calidad biológica (Vilchis, 2016, NOM-003-SAG/GAN-2017).

2.2 BACTERIAS FARMACORRESISTENTES.

La farmacorresistencia es un fenómeno evolutivo natural; cuando una población bacteriana se expone a cierto antibiótico, los microorganismos sensibles mueren y los resistentes sobreviven, transmitiendo la resistencia a su descendencia.

Este fenómeno se ve favorecido por el uso inadecuado de los antibióticos como la prescripción excesiva (cuando no está justificada) y la selección inadecuada de tratamiento (tipo, dosis, curso) por médicos y personal de las farmacias, así como la auto prescripción y falta de seguimiento del tratamiento por parte de los consumidores (Camacho, 2013).

Algunos de los factores que se han relacionado con la prescripción inadecuada en México son las deficiencias en la educación médica de pre y posgrado; la falta de información independiente sobre medicamentos; la influencia de la información proporcionada por la industria farmacéutica; la percepción de las expectativas de los pacientes en cuanto a recibir medicamentos y, por último, la prevalencia de patrones de tratamientos incorrectos pero institucionalizados (Alba, 2013).

Los antimicrobianos se encuentran entre los medicamentos que más se venden y se consumen en México: representan un mercado anual de 960 millones de dólares y el segundo lugar en ventas anuales (14.3%) en farmacias privadas del país, una proporción alarmante cuando se compara con otros países desarrollados o en transición con mercados farmacéuticos grandes.

Para lograr una prescripción adecuada de antibióticos deben tomarse en cuenta varios factores como son:

- a) Conocimiento de la epidemiología local y regional de las bacterias implicadas en la producción de procesos infecciosos, lo que incluye su sensibilidad a antimicrobianos.
- b) Conocimiento de la farmacología y farmacocinética de los antimicrobianos
- c) Indicación correcta
- d) Prescripción correcta
- e) Cumplimiento del tratamiento
- f) Seguimiento

Cuando no se cumple lo anterior, pueden presentarse entre otros, la falta de respuesta al tratamiento, fracaso terapéutico, recaídas, desarrollo de resistencia bacteriana enmascaramiento de procesos infecciosos, presencia de efectos adversos, interacciones medicamentosas, toxicidad, desajuste de microbiota normal y prolongación de la enfermedad (Alba, 2013).

La resistencia bacteriana a los antibióticos se encuentra en constante evolución, de manera frecuente se reportan nuevos mecanismos de resistencia bacteriana a

los antibióticos tanto en bacterias Gram positivas como en bacterias Gram negativas (Rodríguez *et al.*, 2015).

La presencia de MDR (Multidrug-Resistant Pathogens) se ha convertido en una grave preocupación, de hecho, la Organización Mundial de la Salud ha reconocido recientemente la resistencia a antibióticos como uno de los tres problemas de salud humana, mas importantes.

Los MDR más comunes e infecciosos se han agrupado bajo el acrónimo “ESKAPE” conformado por: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter spp.*

Las definiciones de resistencia se clasifican según el número y la clase de antibióticos afectados. La multiresistencia (Multiple Drug Resistance, MDR) se define como la ausencia de sensibilidad a, por lo menos, un fármaco en tres o más de las categorías de antibióticos; la resistencia extensa (Extensively Drug-Resistant, XDR) se refiere a la ausencia de sensibilidad a, por lo menos, un agente en todas las categorías excepto en dos de ellas o menos (Rodríguez *et al.*, 2015) y (Pandrug Resistant, PDR) habla de la resistencia a todos los agentes antimicrobianos, resistencia a todos los agentes antimicrobianos comerciales o resistencia a todos los agentes antimicrobianos probados rutinariamente (Magiorakos *et al.*, 2011).

2.2.1 Clasificación de los antibióticos.

De acuerdo al mecanismo de acción, se clasifican en nueve grandes grupos:

Tabla 3. Clasificación de los antibióticos y mecanismo de acción.

Grupos de antibióticos	Ejemplos	Blancos
Betalactámicos	Penicilinas Cefalosporinas Carbanapems	Inhibición de síntesis del peptidoglicano de la pared celular
Glicopéptidos	Vancomicina	
Tetraciclinas	Oxitetraciclinas	Inhibición de síntesis de proteínas
Aminoglucósidos	Gentamicina	
Macrólidos	Eritromicina	
Oxazolidinonas	Linezolid	
Rifamicinas	Rifampicinas	Inhibición de la RNA polimerasa (desactivación de la transcripción)
Quinolonas	Ciprofloxacino	Inhibición de la DNA girasa (impiden superenrollamiento de DNA)
Inhibidores del metabolismo del folato	Trimetoprima Sulfonamida	Inhibición de síntesis de nucleótidos (impiden replicación de DNA)

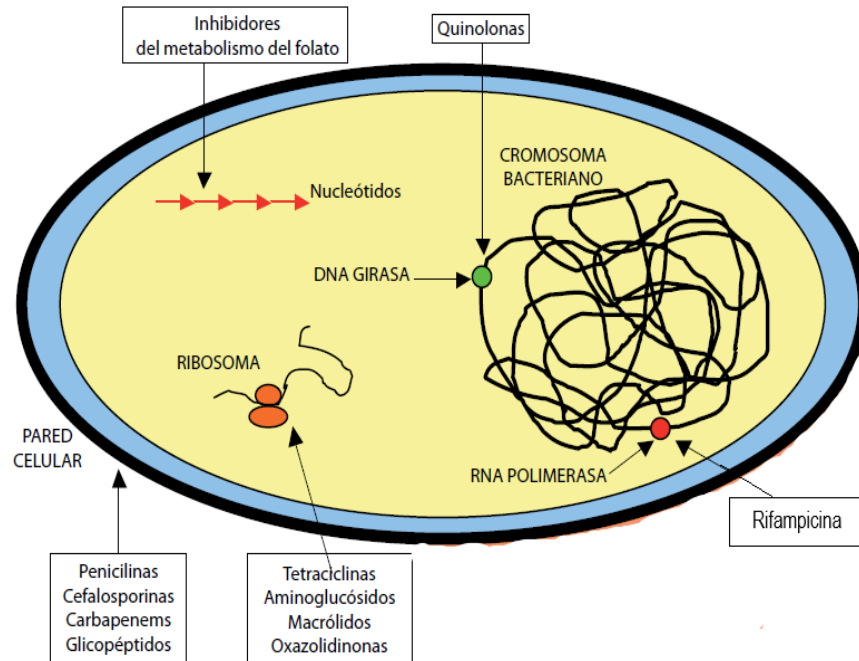


Figura 5. Blancos de distintos grupos de antibióticos
Fuente: Mendoza, 2011.

2.2.2 Importancia clínica de los microorganismos ESKAPE.

La mayoría de los problemas de resistencia en los hospitales modernos se concentran en un número limitado de especies bacterianas, que se han agrupado bajo el acrónimo de los patógenos "ESKAPE" (Rice, 2010). Se acuñó dicho término a este grupo de microorganismos, para hacer referencia a un conjunto de bacterias con poder patógeno y que además en el transcurso del tiempo han logrado adquirir una gran variedad de mecanismos de resistencia a múltiples antibióticos que le permiten en la actualidad evadir prácticamente la mayoría de opciones terapéuticas disponibles.

Bajo esta nomenclatura se agrupan:

- E:** *Enterococcus faecium*
- S:** *Staphylococcus aureus*
- K:** *Klebsiella pneumoniae*
- A:** *Acinetobacter baumannii*
- P:** *Pseudomonas aeruginosa*
- E:** *Enterobacter* spp.

Tabla 4. Grupo E.S.K.A.P.E. Características, importancia clínica y resistencia.

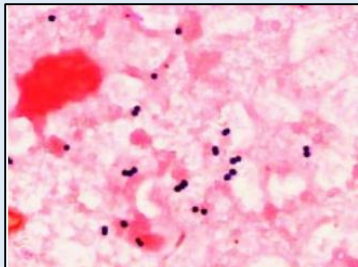
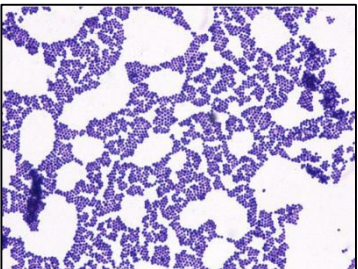
	Características	Patogenicidad y Virulencia	Resistencia	
<i>Enterococcus faecium</i>	Cocos grampositivos, forma pares, o cadenas cortas. Catalasa negativo. Anaerobios facultativos (Acosta-Gnass, 2005).	Son la tercera causa más común de infección nosocomial (Paganelli et al., 2013); causando infecciones de las vías urinarias, endocarditis, bacteriemia, abscesos intra-abdominales e intra-pélvicos (Bhardwaj et al., 2013). La patogénesis se debe a la formación de biopelículas con múltiples capas (Paganelli et al., 2013). Dentro de los factores de virulencia está la presencia de hemolisinas, bacteriocinas, proteasas y aglutininas (Díaz, Rodríguez y Zhurbeko, 2010).	Resistencia intrínseca a varios antibióticos, incluyendo cefalosporinas, meropenem, ertapenem, penicilinas resistentes a penicilinas, clotrimoxazol, aminoglucósidos y clindamicina (Díaz et al., 2010).	 <p>Figura 6. Frotis de sangre periférica que muestra cocos en pares. Fuente: Gutiérrez, Cacho y García (2010).</p>
<i>Staphylococcus aureus</i>	Cocos grampositivos, forman pares, cadenas cortas o racimos. Catalasa y coagulasa positivo. Anaerobio facultativo (Bustos, Hamdan y Gutiérrez, 2006)	Puede producir enfermedad por toxinas o superantígenos, invadir cualquier órgano o tejido y originar supuración, necrosis tisular, trombosis vascular y bacteriemia. Es el microorganismo con mayor capacidad de originar metástasis por vía hematogena (Mensa et al., 2013). Casi todas las cepas producen un grupo de enzimas y citotoxinas. Dentro de estas hay cuatro hemolisinas (alfa, beta, gamma y delta), nucleasas, proteasas, lipasas, hialuronidasa y colagenasa (Bustos et al., 2006).	Es resistente a los antibióticos beta lactámicos, por la producción de betalactamasas, y debido a cambios estructurales en el sitio de unión del fármaco, como es el caso de la resistencia a la oxacilina. Posteriormente surgieron nuevos antibióticos como la vancomicina y la teicoplanina, se reportó en 1997 resistencia intermedia a vancomicina y para el 2000, alto nivel de resistencia a éste antibiótico (Hernández et al., 2010).	 <p>Figura 7. “<i>Staphylococcus aureus</i>”. Morfología microscópica. Fuente: Kocsis (2014).</p>

Tabla 4. Grupo E.S.K.A.P.E. características, importancia clínica y resistencia (Continuación...)

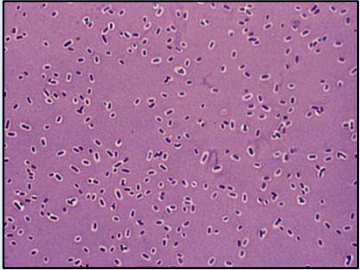

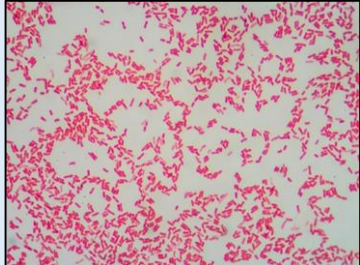
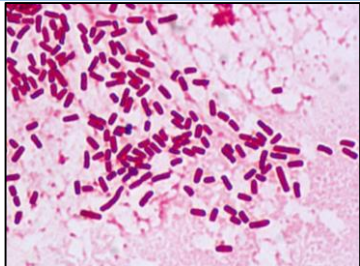
	Características	Patogenicidad y Virulencia	Resistencia	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Bacilos gramnegativos, anaerobios facultativos, inmóviles, encapsulados, fermentan la lactosa (Echeverri y Cataño, 2010).	Es responsable de infecciones nosocomiales del tracto urinario, septicemia, neumonía e infecciones intra- abdominales. También puede causar neumonía grave, bacteriemia y meningitis (Decré et al., 2011).	Usualmente desarrolla una cápsula que actúa como factor determinante en la virulencia de la bacteria, ésta protege al microorganismo de la fagocitosis por parte de los polimorfonucleares y de los factores bactericidas séricos, inhibiendo la activación del complemento (López y Echeverri, 2010).	 <p>Figura 8. Cápsula translúcida de <i>Klebsiella pneumoniae</i> en una tinción de Gram, usando un microscopio de contraste de fases. Fuente: López y Echeverri (2010).</p>
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Cocobacilo gramnegativo, aerobio estricto, no fermentador, catalasa positivo, oxidasa positivo, e inmóvil (Hernández et al., 2010).	Las infecciones nosocomiales en que se aísla incluyen: neumonía asociada a ventilación mecánica, infecciones de piel y tejidos blandos, infecciones de heridas, infecciones del tracto urinario, meningitis postquirúrgicas o en relación con drenajes ventriculares y bacteriemias primarias (Hernández et al., 2010).	Resistente a múltiples antibióticos: a los betalactámicos, debido a la producción de betalactamasas de espectro extendido (BLEE), metalo-beta-lactamasas, alteraciones de las proteínas ligadoras de penicilina, disminución de la permeabilidad de la membrana externa, mutación de los sitios blanco e inactivación de los sitios por enzimas modificantes (Díaz, 2010).	 <p>Figura 9. “<i>Acinetobacter baumannii</i>”, oportunista asociado con infecciones intrahospitalarias. Fuente: Hernández et al., (2010).</p>

Tabla 4. Grupo E.S.K.A.P.E. características, importancia clínica y resistencia (Continuación...)

	Características	Patogenicidad y Virulencia	Resistencia	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Bacilo gramnegativo, no esporulado, aerobio, es móvil por la presencia de un flagelo polar. Produce piocinina, un pigmento verdoso que ayuda en su identificación y es no fermentador (Castro, 2014).	Es altamente virulenta en personas con rotura de la barrera cutánea y de la mucosa (quemaduras, dermatitis, fibrosis quística, traumatismos penetrantes, cirugía), en pacientes con inmunosupresión (neutropenia, hipogammaglobulinemia, diabetes mellitus, cáncer, cateterizados, entre otros) y por trastorno de la biota bacteriana (Castro 2014).	Es resistente a varios antibióticos debido a la baja permeabilidad de su membrana externa, la expresión constitutiva de varias bombas de flujo y la producción de enzimas inactivadoras de antibióticos. (Mesaros et al., 2007).	 <p>Figura 10. “<i>Pseudomonas aeruginosa</i>” es la especie patógena más frecuente en humanos. Fuente: Castro (2014)</p>
<i>Enterobacter spp.</i>	Bacilos gramnegativos, anaerobios facultativos, no esporulados oxidasa negativo, catalasa positivos. Presentan antígenos que permiten su serotipificación (<i>E. aerogenes</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>E. sakazakii</i>). (Castro, 2014).	Frecuentes en brotes nosocomiales. Las infecciones más comunes son las de heridas quirúrgicas, las del tracto respiratorio, las urinarias y las bacteriemias relacionadas con los catéteres intravenosos, endocarditis en pacientes con prótesis valvulares y de meningitis secundarias a procedimientos neuroquirúrgicos (Galí, 2010).	Resistente a los antibióticos betalactámicos, debida a la activación de una betalactamasa cromosómica que inactiva incluso cefalosporinas de tercera generación (Galí, 2010).	 <p>Figura 11. “<i>Enterobacter cloacae</i>”. Fuente: Galí (2010).</p>

2.2.3 *Escherichia coli*, importancia clínica.

Escherichia coli es un bacilo corto gramnegativo, oxidasa negativo, anaerobio facultativo, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, coloniza el intestino del hombre pocas horas después de su nacimiento, se considera parte de la biota normal (Castro, 2014) pero agrupa diversas cepas que causan padecimientos extra intestinales y otras que destacan entre los principales agentes etiológicos del síndrome diarreico.

La frecuencia de cepas de *E. coli* patogénicas y no patogénicas ha mostrado una proporción heterogénea bajo condiciones endémicas; mientras que en los brotes se ha encontrado un patrón homogéneo debido a la extensión de las aguas residuales en comunidades cercanas a la Ciudad de México.

En algunos estudios realizados por el InDRE (Instituto de Referencia Epidemiológica) se advirtió que EPEC (*Escherichia coli* Enteropatógena) puede causar de 17% a 19% de los casos de diarrea infantil en diversas regiones del país. Esto indica que, en México, uno de cada cinco niños que enferma de diarrea puede estar infectado por este grupo de *E. coli* (Hernández et al., 2011).

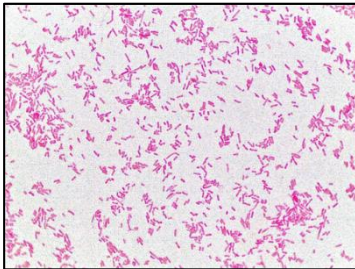


Figura 12. “*Escherichia coli*”. Especie bacteriana más común de la microbiota intestinal.

Fuente: Hernández et al., (2011).

3. OBJETIVOS.

3.1 Objetivo General.

Determinar la actividad antibacteriana de propóleos mexicanos *in vitro* sobre cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, provenientes de muestras clínicas, para establecer las bases de un tratamiento complementario.

3.2 Objetivos Particulares.

1. Obtener muestras de propóleos de diferentes estados de la República Mexicana.
2. Evaluar las especificaciones químicas (presencia y cuantificación de fenoles y flavonoides) utilizando como guía la NOM-003-SAG/GAN-2017, Propóleos, producción y especificaciones para su procesamiento
3. Evaluar la actividad antimicrobiana frente a las cepas de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli* provenientes de muestras clínicas, utilizando como guía la NOM-003-SAG/GAN-2017.
4. Demostrar si los propóleos cumplen con los parámetros establecidos en las normas de calidad para ser utilizados como tratamiento complementario.

4. HIPÓTESIS.

Dado que se ha demostrado *in vitro* la actividad bactericida del propóleo debido al sinergismo de sus componentes, mediante la inhibición de la motilidad, desorganización de la membrana plasmática, pared celular y citoplasma e inhibición de enzimas esenciales para la replicación, se espera que los propóleos mexicanos con mayor cantidad de compuestos fenólicos y flavonoides inhiban el crecimiento de las cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* de origen clínico, ya que resulta de vital importancia un tratamiento complementario que pueda potencializar el efecto de los antibióticos prescritos para el tratamiento de éstas, pues constituyen en la actualidad un problema de salud intrahospitalario, debido al hallazgo de resistencia bacteriana a múltiples familias de antimicrobianos.

5. JUSTIFICACIÓN.

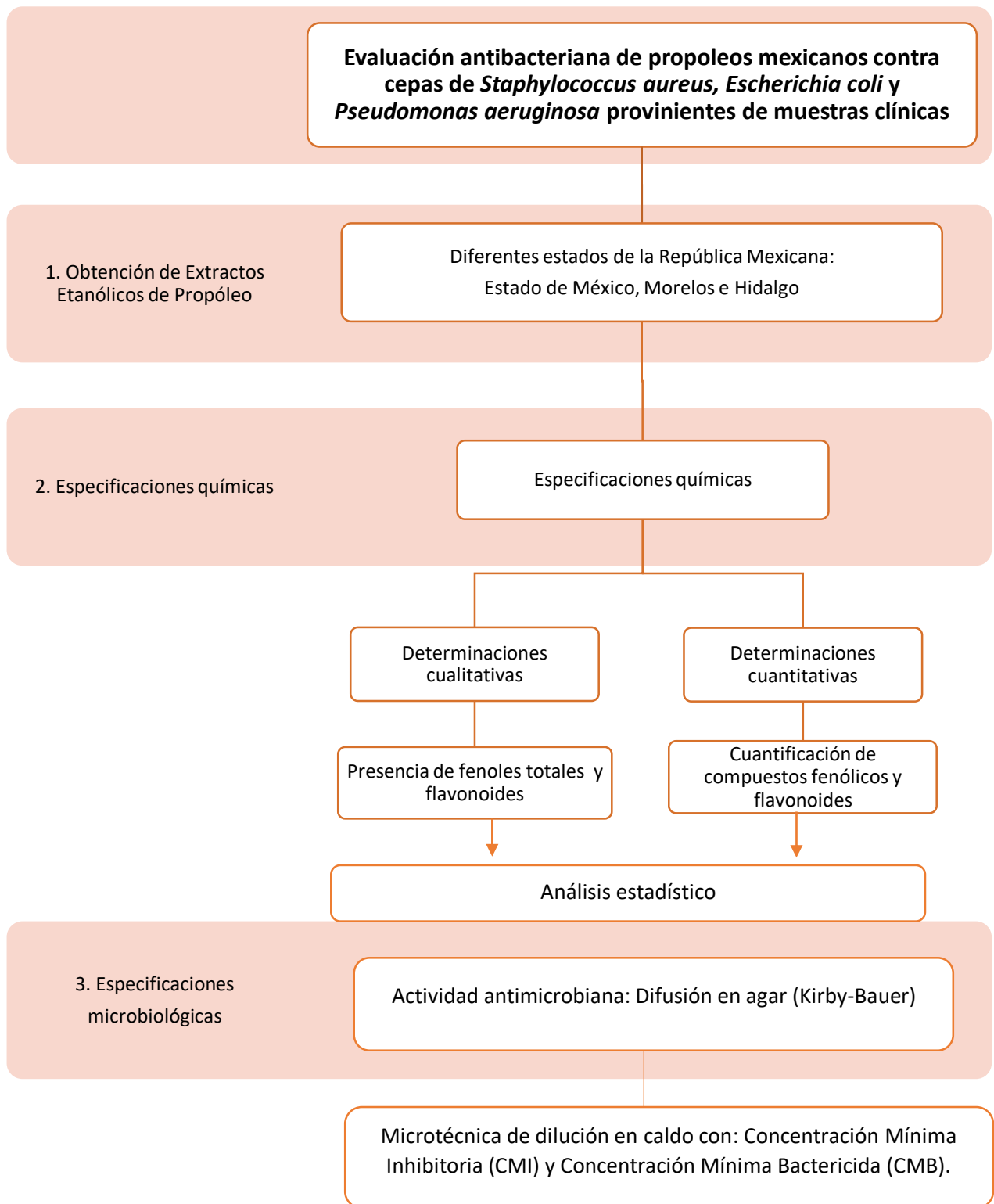
A nivel mundial, se ha presentado una creciente demanda de productos naturales en el mercado, para su uso en el tratamiento de diversas etiologías, debido a los efectos secundarios cada vez más frecuentes de los medicamentos alopáticos como la resistencia bacteriana. Sin embargo, no se posee la información necesaria para garantizar el consumo seguro de la mayoría de los productos naturales, por esta razón, es de vital importancia realizar numerosos estudios respecto a éstos.

Resulta imprescindible la búsqueda de alternativas para el tratamiento de infecciones ocasionadas por organismos farmacorresistentes, presentes en hospitales.

La efectividad antibacteriana demostrada *in vitro* e *in vivo* sobre bacterias de importancia clínica en medicina humana y veterinaria, ha llevado a proponer al propóleo como un tratamiento complementario para combatir las infecciones bacterianas. Es una alternativa viable debido a la extensa gama de actividades farmacológicas demostradas en estudios anteriores.

6. METODOLOGÍA.

6.1 Diagrama experimental.



6.2 Obtención del Extracto Etanólico de Propóleo (EEP).

Se emplearon tres muestras de extractos etanólicos de propóleo provenientes de diferentes estados de la República Mexicana: Morelos, Hidalgo y Estado de México (Toluca).

Los EEP fueron proporcionados por el Laboratorio de Bioprospección Microbiológica de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria, Campo 4, de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

6.3 Pruebas cualitativas.

Se realizaron dos pruebas cualitativas para determinar la presencia de fenoles totales y flavonoides.

6.3.1 Determinación cualitativa de fenoles totales.

La mayor parte de los fenoles dan disoluciones coloreadas (azul, verde, violeta, entre otros). Si el color es amarillo débil (mismo que el reactivo), la reacción se considera negativa.

La metodología completa para la detección cualitativa de compuestos fenólicos se encuentra en el Anexo 1.

6.3.2 Determinación cualitativa de flavonoides.

Para la detección de flavonoides se utiliza hidróxido de sodio (NaOH) al 20 %. Un color amarillo intenso es característico de los flavonoides.

La metodología completa para la detección cualitativa de flavonoides se encuentra en el Anexo 2.

6.4 Pruebas Cuantitativas.

Se construyó una curva de calibración de fenoles y flavonoides utilizando una disolución estándar de ácido gálico y quercetina, respectivamente.

La relación entre las concentraciones y las absorbancias de las soluciones estándar permitió determinar el contenido de compuestos fenólicos y flavonoides en las muestras preparadas a una concentración de 0.05 mg/mL, utilizando la ecuación de regresión correspondiente a cada prueba (NOM-003-SAG/GAN-2017). El resultado se expresó en porcentaje (%) para ambas determinaciones.

6.4.1 Cuantificación de compuestos fenólicos.

La concentración de compuestos fenólicos se midió por espectrofotometría de absorción UV-VIS con base a una reacción colorimétrica de óxido-reducción, utilizando un agente oxidante, el reactivo de Folin-Ciocalteu.

La metodología completa para la cuantificación de compuestos fenólicos se encuentra en el Anexo 3.

6.4.2 Cuantificación de flavonoides.

Para la cuantificación de flavonoides se utilizó el colorimétrico de $(AlCl_3)$, y el principio es que éste forma complejos estables de ácidos con el grupo cetona en C-4; el grupo hidroxilo en C-3 o C-5 de flavonas y flavonoles; forma complejos lábiles ácidos con los grupos hidroxilo en el anillo A o B de los flavonoides.

La metodología completa para la cuantificación de flavonoides se encuentra en el Anexo 4.

6.5 Prueba de sensibilidad bacteriana (Antibiograma).

Las pruebas de sensibilidad bacteriana se llevan a cabo mediante un antibiograma que se utiliza para medir la sensibilidad de una cepa bacteriana a uno o varios antibióticos.

La metodología completa de la Prueba cualitativa de difusión en agar se describe en el Anexo 5.

6.6 Prueba de Difusión en Agar.

Es una prueba cualitativa que refleja si el propóleo a evaluar, inhibe el crecimiento bacteriano, por medio de sensidiscos impregnados con el extracto etanólico de propóleo que difundirá sobre la placa de agar.

La metodología completa de la Prueba cualitativa de difusión en agar se encuentra en el Anexo 6.

6.7 Determinación de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Bactericida (CMB) por el método de microdilución en caldo.

La concentración a la cual existe una disminución drástica del crecimiento representa la *Concentración Mínima Inhibitoria* (CMI). La concentración que produce una inhibición completa del desarrollo del crecimiento bacteriano representa la *Concentración Mínima Bactericida* (CMB); en todos los casos, esta prueba se realizó por triplicado, utilizando las cepas provenientes de muestras clínicas de *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa* y *Escherichia coli*.

La metodología completa de la determinación de la CMI y CMB se encuentra en el Anexo 7.

7. RESULTADOS Y ANÁLISIS.

El propóleo es un producto natural ampliamente utilizado por sus propiedades biológicas, que dada la demanda que ha adquirido en los últimos años, requiere del establecimiento de parámetros de control de calidad para posicionarse como un producto seguro y eficiente en el mercado nacional e internacional (Vilchis, 2016).

Posee numerosos usos en la medicina tradicional y los estudios sobre productos naturales en México, son escasos. A la fecha, la mayor parte de estudios se han hecho con muestras provenientes de Europa, Brasil y Cuba (Bankova *et al.*, 2000), sin embargo, hay pocos estudios destinados a determinar la composición química y las actividades farmacológicas de los propóleos mexicanos (Valencia *et al.*, 2012).

Es necesario hacer mención especial de que en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campo 4, en la Unidad de Investigación Multidisciplinaria se encuentra el primer Laboratorio de Análisis de propóleos desde donde se impulsó la creación de la “NORMA Oficial Mexicana NOM-003-SAG/GAN-2017, Propóleos, producción y especificaciones para su procesamiento”; establecieron de esta forma, las bases para el estudio integral de los propóleos mexicanos.

Las características de la zona donde el propóleo fue recolectado resultan determinante para la caracterización integral del propóleo. Gran parte de la flora circundante a la colmena es utilizada por la colonia como fuente de metabolitos secundarios que integran la composición química del propóleo que se produce en cada zona, de manera particular:

- En el Estado de México, el tipo de vegetación consiste en bosques de pino, de encino, de oyamel, bosques mesófilos de montaña, matorrales xerófitos, selva baja caducifolia, pastizales naturales y pastizales de alta montaña.
- En el estado de Hidalgo, existe una amplia variedad de vegetación por los diferentes climas y altitudes que se presentan en la entidad. Predominan los bosques húmedos de montaña y los bosques de coníferas y encinos, seguidos de pastizales y matorrales. Las selvas perennifolias se sitúan principalmente al norte y noreste del estado. También existen pastizales cuya distribución se concentra en el centro y de manera más dispersa en el occidente y en el sur (SMA, 2008).
- El estado de Morelos posee una gran diversidad ambiental, la cual ha dado lugar al establecimiento de siete tipos de vegetación: bosque de coníferas, bosque de Quercus, bosque mesófilo de montaña, bosque tropical caducifolio, pastizal, zacatonal, bosque de galería y vegetación acuática (CONABIO y UAEM, 2004).

La flora de los sitios de donde provienen los extractos analizados es sumamente heterogénea, por lo que no se pueden establecer parámetros específicos para realizar caracterizaciones físicas o químicas puntuales.

El mayor problema que existe actualmente, a pesar de contar con diversos avances tecnológicos que permiten conocer la composición química de los propóleos, es la variabilidad de la misma, dependiendo del sitio y método de colecta, de los diferentes ecosistemas, del tipo de abeja y de sus fuentes botánicas (Papotti *et al.*, 2012).

7.1 Pruebas cualitativas.

El conocimiento de la composición química de los propóleos es de vital importancia para correlacionarla con las actividades biológicas que aportan los mismos. Por otra parte, permite controlar la calidad de las formas farmacéuticas desde un punto de vista químico y determinar las dosis efectivas en las mismas (Palacios y Pérez, 2016).

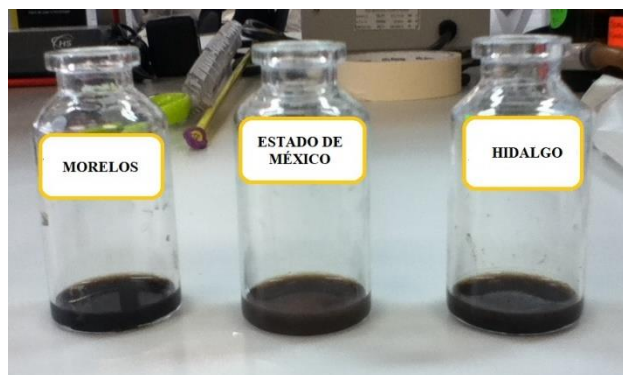
Dentro de la gran cantidad de componentes que presenta el propóleo, se ha identificado por métodos cromatográficos que la mayor proporción la ocupan los fenoles y flavonoides, por lo que se propuso que la presencia y concentración de éstos dos grupos de compuestos, serían un parámetro conveniente a analizar para determinar la calidad de los propóleos como lo establece la NOM-003-SAG/GAN-2017 (Vilchis, 2016). Cambiar de lugar

Se realizó la determinación cualitativa y cuantitativa de fenoles y flavonoides con la finalidad de realizar la comparación con los valores establecidos por la norma.

7.1.1 Determinación cualitativa de fenoles totales.

Para revelar la presencia de compuestos fenólicos se utilizó una solución de cloruro férrico (FeCl_3). Los fenoles dan diferentes coloraciones debido a la formación de diferentes complejos de coordinación con el hierro.

Existen otros complejos que también dan coloración con este reactivo como los ácidos hidroxámicos y los enoles. Ocasionalmente, el color dado por un fenol con el reactivo puede servir de ayuda para la determinación de la estructura química. La pirocatequina y otros o- hidroxí derivados del benceno, dan coloraciones verdes. El ácido salicílico da un color rojo intenso; muchos o-hidroxibenzaldehídos y cetonas dan colores que van del rojo al púrpura, más intensos que los fenoles sencillos (Geissman, 1974).



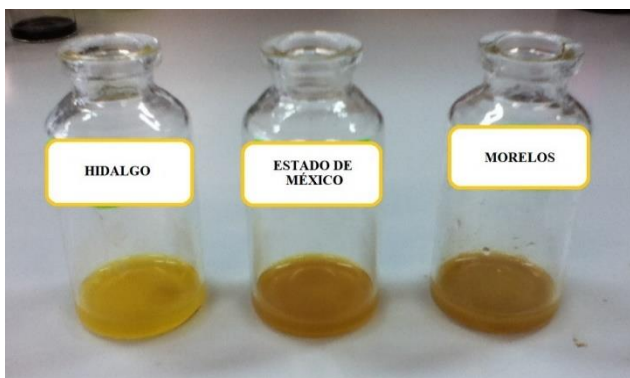
Se observan tonalidades marrón a negro que evidencian la presencia de compuestos fenólicos en los tres propóleos evaluados. La intensidad es proporcional a la cantidad de fenoles en la muestra.

No hay diferencia notable entre los tres extractos (Figura 13).

Figura 13. Prueba cualitativa de fenoles totales.

7.1.2 Determinación cualitativa de flavonoides.

Respecto a la presencia de flavonoides, se utilizó como prueba cualitativa el ensayo con hidróxido de sodio (NaOH) el cual reacciona con los flavonoides y las flavonas dando soluciones amarillas y anaranjadas principalmente. Los compuestos que tienen -OH adyacentes tanto en el anillo A como en el B, se descomponen dando color amarillo a rojo.



Se observa una tonalidad amarillo claro y brillante en el propóleo de Hidalgo. Los propóleos de Toluca y Morelos presentaron una coloración amarilla/naranja opaca. Se evidencia la presencia de flavonoides en los tres propóleos. El extracto de Hidalgo presentó una coloración más intensa respecto a los extractos de Toluca y Morelos (Figura 14).

Figura 14. Prueba cualitativa de flavonoides.

7.2 Pruebas cuantitativas.

7.2.1 Cuantificación de compuestos fenólicos.

Se realizó la determinación cuantitativa de fenoles por el método de Folin-Ciocalteu; los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo que contiene tungstofosfato y molibdofosfato a pH básico, dando lugar a un complejo de coloración azul.

Se muestran en la tabla 5 los valores obtenidos comparados con los establecidos en la NOM-003-SAG/GAN-2017.

Tabla 5. Cuantificación de compuestos fenólicos.

Propóleo	%	Valor de referencia
Estado de México	6.8	5 %
Morelos	43.9	
Hidalgo	54.1	

Los tres extractos evaluados sobrepasan el 5% establecido por la Norma como mínimo para que el extracto tenga actividad biológica. El extracto de Hidalgo presentó la concentración más alta de fenoles con respecto a los extractos de Morelos y Estado de México, lo cual puede deberse al tipo de vegetación circundante a las colmenas.

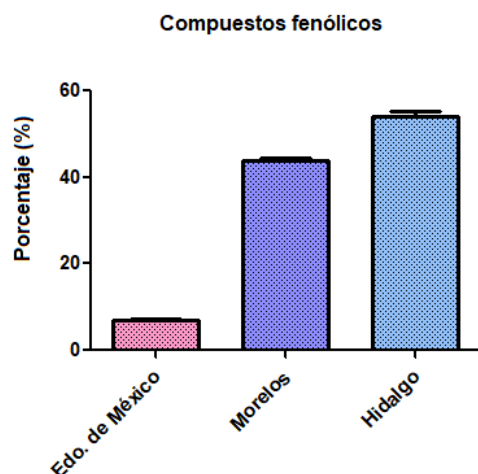


Gráfico 1. Determinación cuantitativa de compuestos fenólicos.

7.2.2 Cuantificación de flavonoides.

La determinación cuantitativa de flavonoides se realizó utilizando una disolución de tricloruro de aluminio ($AlCl_3$). En principio de este método se basa en la reacción del reactivo con los flavonoides en medio alcalino formando un complejo de color amarillo. El aluminio forma quelatos con flavonoides *o*-dihidroxiados, 3-hidroxiados y 5-hidroxiados.

En la tabla 6 se muestran los valores obtenidos comparados con los establecidos en la NOM-003-SAG/GAN-2017.

Tabla 6. Cuantificación de flavonoides en extractos etanólicos.

Propóleo	%	Valor de referencia
Estado de México	0.97	0.5 %
Morelos	2.18	
Hidalgo	3.05	

Los tres extractos presentaron un porcentaje mayor de contenido de flavonoides con respecto a los establecidos en la Norma como mínimo. El extracto de Hidalgo presentó mayor porcentaje, resultado que se relaciona con el contenido de compuestos fenólicos.

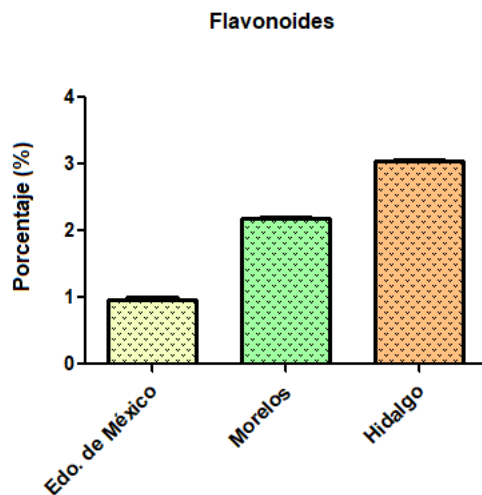


Gráfico 2. Determinación cuantitativa de flavonoides.

Las propiedades antimicrobianas del propóleo han sido estudiadas desde finales de la década de los cuarenta. En ensayos *in vitro* se ha demostrado que los extractos de propóleos son activos frente a numerosos microorganismos, siendo más eficaces en un gran número de bacterias Gram positivas, pero con limitada actividad sobre Gram negativas (Marcucci *et al.*, 2001; Choi *et al.*, 2006).

7.3 Prueba de Sensibilidad Bacteriana (Antibiograma).

Se realizó la prueba de Sensibilidad Bacteriana (Antibiograma) a cinco cepas provenientes de muestras clínicas, a las que se sometió de manera previa una "Identificación microbiana mediante el Sistema VITEK 2", obteniendo un nivel de confianza de "Identificación excelente" para las siguientes bacterias:

- Tres cepas de *Staphylococcus aureus* (identificadas en adelante como 1, 2 y 3)
- Una cepa de *Pseudomonas aeruginosa*
- Una cepa de *Escherichia coli*

Los resultados obtenidos del Sistema VITEK 2, se encuentran en los Anexos 8, 9, 10, 11 y 12.

Posteriormente, se realizó un Antibiograma a cada cepa previamente identificada, con "Multidiscos Combinados: 71080380 de papel filtro para el estudio *in vitro* de sensibilidad bacteriana BIO-RAD", obteniendo los siguientes resultados:

Tabla 7. Prueba de Sensibilidad Bacteriana (Antibiograma).

ANTIBIOGRAMA					
	<i>S. aureus</i> (1)	<i>S. aureus</i> (2)	<i>S. aureus</i> (3)	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i>
Ampicilina	R	R	R	R	S (20 mm)
Amikacina	S (21 mm)	S (20 mm)	S (20 mm)	S(17 mm)	R
Cefalotina	R	S (19 mm)	R	R	R
Ceftriaxona	R	I (17 mm)	R	I (17 mm)	R
Cloranfenicol	R	S (20 mm)	R	R	R
Dicloxacilina	R	R	R	R	R
Enoxacina	R	S (18 mm)	R	S(19 mm)	R
Eritromicina	R	R	R	R	R
Gentamicina	R	S (20 mm)	R	R	R
Netilmicina	S (15 mm)	S(24 mm)	S (15 mm)	R	S (17 mm)
Penicilina	R	R	R	R	R
Trimetoprim / Sulfametoxazol	S (21 mm)	S (25 mm)	S (17 mm)	R	S(20 mm)

Resistente	Intermedio	Sensible
------------	------------	----------

Se evidenció la resistencia de las cinco cepas de bacterias evaluadas, con respecto a los 12 antibióticos a los que fueron expuestas.

Los halos de inhibición para determinar la sensibilidad fueron comparados con el inserto de los multidiscos utilizados, el cual puede consultarse en el Anexo 13.

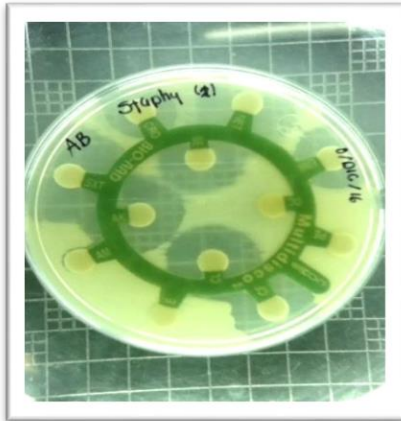


Figura 15. Resultados de Prueba de Sensibilidad bacteriana para cepa de *Staphylococcus aureus* (1).

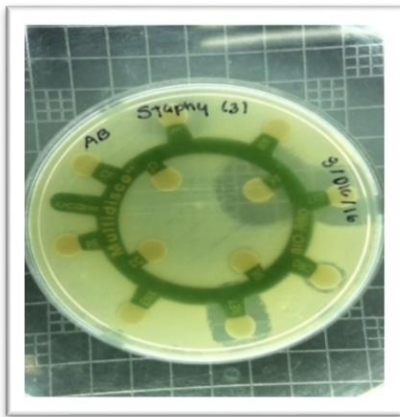


Figura 16. Resultados de Prueba de Sensibilidad bacteriana para cepa de *Staphylococcus aureus* (2).

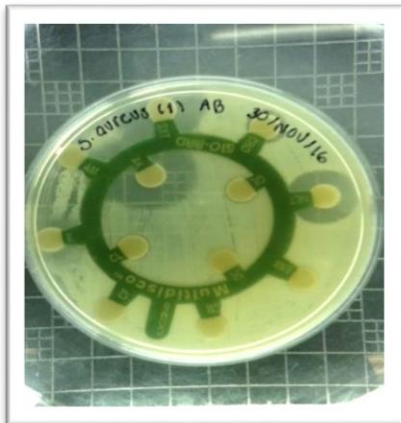


Figura 17. Resultados de Prueba de Sensibilidad bacteriana para cepa de *Staphylococcus aureus* (3).



Figura 18. Resultados de Prueba de Sensibilidad bacteriana para cepa de *Pseudomonas aeruginosa*.

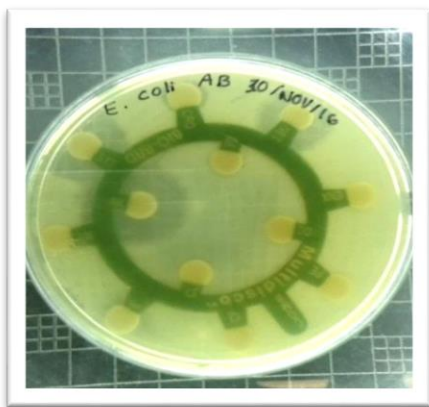


Figura 19. Resultados de Prueba de Sensibilidad bacteriana para cepa de *Escherichia coli*.

La mayoría de los problemas de resistencia en los hospitales modernos se concentran en un número limitado de especies bacterianas, que se han agrupado bajo el acrónimo de los patógenos "ESKAPE". Los datos más recientes disponibles de la Red Nacional de Seguridad Sanitaria indican que los patógenos ESKAPE están involucrados aproximadamente en el 40 % de las infecciones de pacientes en las unidades de cuidados intensivos (Rice, 2010).

Cuatro de las cinco cepas evaluadas pertenecen al grupo "ESKAPE" (*Staphylococcus aureus* 1, 2, 3 y *Pseudomonas aeruginosa*), en términos muy generales, hablando sólo del género y especie a la que corresponden, pues se requiere de una evaluación más compleja para poder situarlas dentro del grupo en cuestión, pues las cepas deben encontrarse dentro de los patrones de resistencia establecidos.

Por ello, grupos internacionales como el European Centre for Disease Prevention Control (ECDC) y el Center for Disease Control and Prevention (CDC) se unieron para crear una terminología internacional estandarizada, con la cual describir los perfiles de resistencia adquiridos.

Los patrones fueron construidos para cada bacteria. Las listas de categorías antimicrobianas propuestas para las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana se

crearon utilizando documentos y puntos de corte del Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI), del European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) y de la United States Food and Drug Administration (FDA).

La MDR (Multiple Drug Resistance) se define como la ausencia de sensibilidad a, por lo menos, un fármaco en tres o más de las categorías de antibióticos.

La XDR (Extensive Drug Resistance) se refiere a la ausencia de sensibilidad a, por lo menos, un agente en todas las categorías excepto en dos de ellas o menos.

La PDR (Pandrug Resistant) habla de la resistencia a todos los agentes antimicrobianos, resistencia a todos los agentes antimicrobianos comerciales o resistencia a todos los agentes antimicrobianos probados rutinariamente (Magiorakos *et al.*, 2011).

Se muestran en la tabla 11, los aislamientos evaluados según la clasificación anterior.

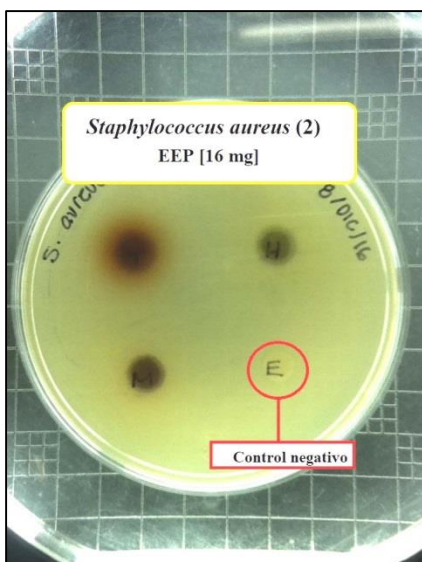
Tabla 8. Clasificación de cepas aisladas. Perfil de Resistencia.

Cepa	Resistencia (Antibiótico/Familia)		Clasificación
<i>Staphylococcus aureus</i> (1)	Ampicilina	Penicilinas	MDR
	Penicilina	Penicilina resistente a penicilinasa**	
	Dicloxacilina**		
	Cefalotina	Cefalosporinas	
	Ceftriaxona		
	Cloranfenicol	Fenicoles	
	Gentamicina	Aminoglucósidos	
<i>Staphylococcus aureus</i> (2)	Enoxacina	Fluoroquinonas	-
	Eritromicina	Macrólidos	
	Ampicilina	Penicilinas	
<i>Staphylococcus aureus</i> (3)	Penicilina	Penicilina resistente a penicilinasa**	MDR
	Dicloxacilina**		
	Cefalotina	Cefalosporinas	
	Ceftriaxona		
	Cloranfenicol	Fenicoles	
	Enoxacina	Fluoroquinonas	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gentamicina	Aminoglucósidos	MDR
	Trimetoprim / Sulfametoxazol	Inhibidores de la vía del folato	
	Ampicilina	Penicilinas	
	Penicilina	Penicilina resistente a penicilinasa**	
	Dicloxacilina**		
	Cefalotina	Cefalosporinas	
	Cloranfenicol	Fenicoles	

**Existen hojas de trabajo establecidas para categorizar a las posibles bacterias ESKAPE, en las que se especifican los antibióticos a los que deben enfrentarse los aislamientos para poder realizar la clasificación adecuada. Debido al material al que se tuvo acceso (número de antibióticos) durante la experimentación de este proyecto, la clasificación sólo es una mera aproximación de la clasificación definitiva (Magiorakos *et al.*, 2011).

7.4 Prueba de difusión en agar.

Se determinó la efectividad de los EEP como inhibidores del crecimiento de las cepas evaluadas por el método de difusión en Agar. Este método está basado en el estudio de la sensibilidad de las bacterias a un antibacteriano, en función del halo de inhibición producido por la difusión del mismo en un medio de cultivo sólido.



La cepa *Staphylococcus aureus* (2), fue la única que demostró sensibilidad a los extractos etanólicos de Hidalgo y Morelos con la presencia de halos de inhibición de 6 y 7 mm en promedio, respectivamente. Estos resultados se relacionan con la cantidad de fenoles y flavonoides determinados en las pruebas cualitativas y cuantitativas realizadas, en las que los EEP tanto de Morelos como de Hidalgo cuentan con mayor concentración de flavonoides, a los que, principalmente, se les atribuye la actividad antibacteriana.

Figura 20. Prueba de difusión en agar, *Staphylococcus aureus* (2)

La actividad antimicrobiana es una de las propiedades fundamentales constatadas en los propóleos, lo cual se puede constatar por la existencia de múltiples estudios bacteriológicos *in vivo* e *in vitro* de ellos, donde se ha confirmado su acción bacteriostática y bactericida que involucra la inhibición de ácidos nucleicos y degradación de la membrana citoplasmática principalmente debido a los flavonoides: acacetina, apigenina, crisina, galangina, kaempferol, naringenina, pinobanksina, pinocembrina y quercetina (Vargas et al., 2014).

Mirzoeva et al., (1997), demostraron que quercetina y naringenina incrementan la permeabilidad y disipan el potencial de la membrana bacteriana (fuerza motriz de protones) disminuyendo la resistencia bacteriana a los antibióticos. Estos flavonoides también impidieron la motilidad bacteriana, factor importante en la virulencia.

Posteriormente, Takaisi evaluó, mediante micro calorimetría y microscopía electrónica el modo de acción antibacteriano del propóleo y encontraron que pinocembrina, galangina y CAPE causan bacteriolisis parcial, previniendo la división celular, desorganizando el citoplasma y la pared e inhiben la síntesis de proteínas y la ARN polimerasa.

El ácido cinámico y algunos flavonoides son los responsables de desacoplar la transducción de energía de la membrana plasmática inhibiendo la motilidad bacteriana. Así mismo, se ha determinado que el propóleo desorganiza la

membrana citoplasmática, la pared celular y el citoplasma provocando una bacteriolisis parcial acompañado de inhibición en la síntesis de proteínas. En lo que se refiere a la galangina se sabe que provoca un incremento considerable en la pérdida de potasio lo cual se atribuye al daño ocasionado directamente en la membrana citoplasmática o bien, podría llevarse a cabo un daño indirecto por un debilitamiento de la pared celular y una lisis como consecuencia de un choque osmótico. Se ha determinado que la quercetina inhibe la ADN girasa de manera parcial (Gutiérrez, 2011).

7.5 Determinación de la CMI y CMB.

Con este método se evalúa cuantitativamente la actividad antibacteriana de los extractos etanólicos.

La concentración a la cual existe una disminución drástica del crecimiento representa la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), mientras que la concentración que produce una inhibición completa del desarrollo representa la Concentración Mínima Bactericida (CMB).

Se realizaron diluciones dobles a lo largo de los 12 pozos de la micro placa estéril, trabajando en un intervalo de concentraciones de 0.003 mg/mL a 8 mg/mL de extracto etanólico de propóleo, colocando un inóculo de la cepa en cada pozo y posteriormente utilizando sales de tetrazolio para medir la actividad respiratoria.

El cloruro de 2,3,5- trifeniltetrazolio es un indicador redox utilizado comúnmente en experimentos bioquímicos para indicar especialmente la respiración celular. El compuesto blanco es reducido enzimáticamente a 1,3,5- trifenilformazán, o simplemente formazán, de color rojo, debido a la actividad de varias deshidrogenasas, enzimas involucradas en la oxidación de compuestos orgánicos y así, del metabolismo celular.

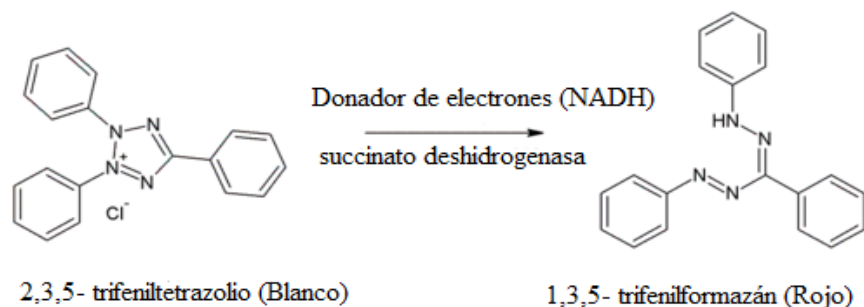


Figura 21. Reacción de reducción de una sal de tetrazolio.

La prueba se realizó para los tres extractos etanólicos, utilizando únicamente la cepa *Staphylococcus aureus* (2), pues fue la única en la que se evidenció actividad antimicrobiana en la prueba cualitativa de Difusión en agar. La prueba fue realizada por duplicado, obteniéndose los siguientes resultados:

Tabla 9. Efecto de los extractos de propóleo frente a la cepa de *Staphylococcus aureus* (2), por la técnica de microdilución en caldo.

<i>Staphylococcus aureus</i> (2)		
	CMI (mg/mL)	CMB (mg/mL)
EEP Morelos	0.062	0.125
EEP Hidalgo	0.031	0.062
EEP Estado de México	Sin actividad	Sin actividad

En la Figura 20, se muestra la CMI de los extractos de Hidalgo y Morelos. Ésta se determinó por la aparición del color rojo característico del formazán que evidencia la reducción del cloruro de tetrazolio y por lo tanto, la presencia de metabolismo celular (presencia de células bacterianas). Un extracto vegetal es activo si su CMI es menor a 1.0 mg/mL cuando se utiliza el método de microdilución en placa (Rios *et al.*,1998). El extracto etanólico de Morelos tuvo una CMI de 0.062 mg/mL y el extracto etanólico de Hidalgo de 0.031 mg/mL, por lo que la mayor actividad antibacteriana la presenta el EEP de Hidalgo. El EEP de Estado de México, no presenta actividad antibacteriana, pues el color rojo del formazán, se encuentra a todas las concentraciones evaluadas, concordando con la prueba cualitativa de Difusión en agar, en la cual no hubo inhibición.

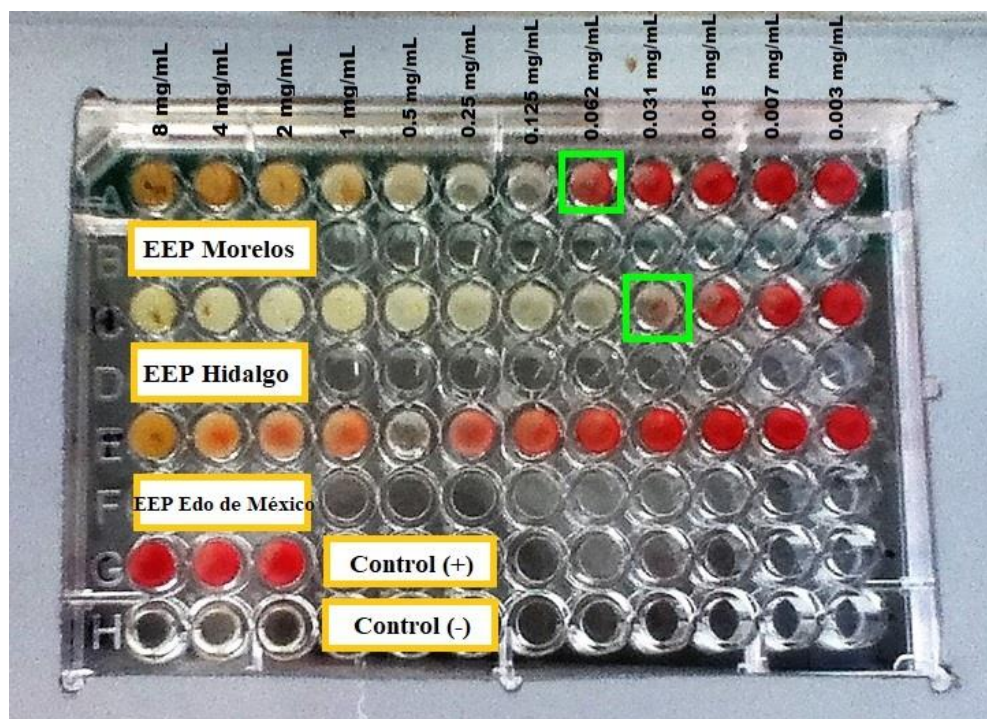


Figura 22. Determinación de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI), por microtécnica de dilución en caldo.

En la Figura 22, se muestra la CMB, donde el pocillo de la microplaca no presenta cambio en la coloración que indica que no hay reducción del reactivo, por la ausencia del microorganismo. El EEP de Morelos tuvo una CMB de 0.125 mg/mL y el EEP de Hidalgo de 0.062 mg/mL, siendo este último el de mayor actividad antibacteriana, pues requirió una concentración menor.

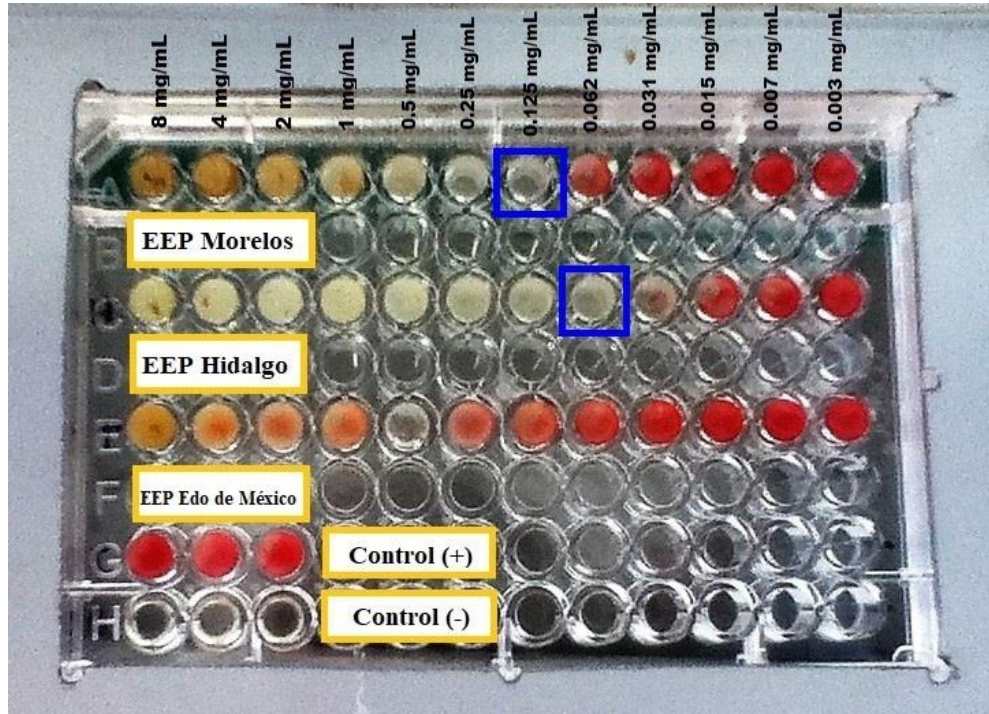
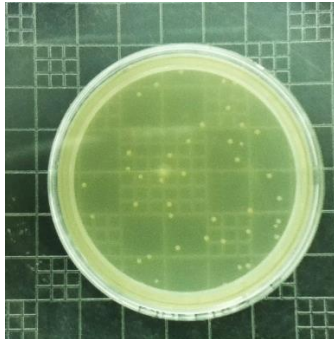


Figura 23. Determinación de Concentración Mínima Bactericida (CMB), por microtécnica de dilución en caldo.

Por último y para evidenciar las CMI y CMB de cada prueba, se tomó un inóculo de proveniente de la microplaca, de cada EEP y se realizó sembrado masivo en agar Müeller Hinton. Se incubó durante 24 horas y se obtuvieron los siguientes resultados:

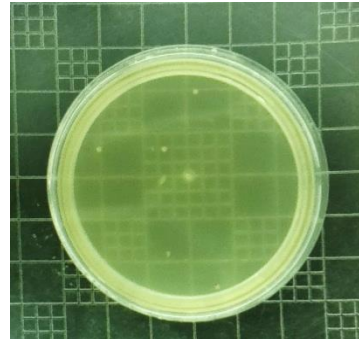
EEP Morelos

CMI



**Figura 24. CMI [0.031 mg/mL] EEP Morelos
42 UFC**

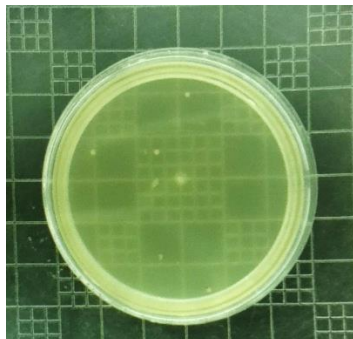
CMB



**Figura 25. CMB [0.062 mg/mL] EEP Morelos
5 UFC**

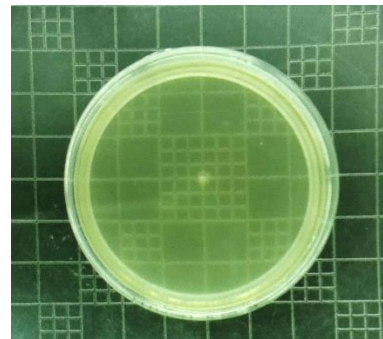
EEP Hidalgo

CMI



**Figura 26. CMI [0.062 mg/mL] EEP Morelos
6 UFC**

CMB



**Figura 27. CMB [0.125 mg/mL] EEP Morelos
Sin crecimiento**

UFC** Unidades Formadoras de Colonias

8 CONCLUSIONES.

1. Se realizaron determinaciones cualitativas y cuantitativas para compuestos fenólicos y flavonoides, metabolitos bioactivos de las muestras provenientes de: Estado de México, Morelos e Hidalgo, con base en la NOM-003-SAG/GAN-2017.
2. Se demostró que los EEP que reportaron concentraciones de compuestos fenólicos y flavonoides altas, cuentan con mayor efectividad antibacteriana con respecto a los que cuentan con concentraciones bajas.
3. Los EEP de Hidalgo y Morelos, demostraron las características necesarias para ser catalogados como propóleos óptimos para ser utilizados como antimicrobianos complementarios.
4. El EEP de Estado de México, presentó concentraciones de fenoles y flavonoides mayores a las mínimas establecidas por la NOM, sin embargo, su actividad antibacteriana fue baja.

9 PERSPECTIVAS.

El propóleo es una mezcla por demás compleja, en donde se encuentran involucrados distintos factores como tipo de abeja, vegetación circundante del apiario, época del año en la que se realiza la recolección de los propóleos, tipo de técnica para la recolección, transporte y almacenamiento del propóleo en greña, tipo de técnica para la obtención de subproductos como tinturas o extractos, entre otros, que están relacionados directamente con la calidad del mismo. Las variables son abundantes y a veces no es factible controlarlas todas, aunque se debe hacer lo necesario para contar con la mayor información posible para cada propóleo, con el fin de poder emitir información viable después de la evaluación de cada uno.

Es importante hacer mención que, aunque se conoce el año de recolección de los propóleos utilizados para la realización de los extractos en este proyecto (2016), no se contaba con la época del año exacta de la misma, ni de la ubicación geográfica concreta de los apiarios, lo que resulta determinante para enriquecer esta investigación con datos más exactos acerca de cada propóleo, de la vegetación posiblemente utilizada por las abejas y de los posibles metabolitos secundarios predominantes en los extractos.

Como perspectivas del proyecto, con el estudio químico de los propóleos de una forma integral en donde intervenga siempre una caracterización cromatográfica para detectar los flavonoides que forman parte de los extractos, así como la cantidad de los mismos, lo que nos puede dar una visión más amplia de qué tipo de actividad biológica nos ofrece cada propóleo.

En este proyecto, se hizo evidente la farmacorresistencia de las cepas bacterianas con las que se trabajó, es importante, de primera instancia evaluar la naturaleza de los aislamientos y para esto se deberá enfocar las pruebas antimicrobianas a pruebas *in vitro* con bacterias provenientes de muestras clínicas, de las que se cuente con información completa acerca de la naturaleza de la misma como: tipo de muestra de la que se realiza el aislamiento bacteriano e historial del paciente (la edad, estudios realizados y resultados de los mismos, si padece o no afecciones crónicas, fármacos administrados si es que se encuentra bajo tratamiento y tiempo del mismo, etc), esto con el fin de establecer bases de datos que nos permitan conocer en qué estadios de las infecciones o en qué tipo de infecciones es viable utilizar extractos de propóleos que potencialicen el efecto de los antimicrobianos.

10. ANEXOS.

ANEXO 1. DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE FENOLES TOTALES.

❖ Para propóleo en greña o extracto etanólico:

- Se tomaron 20 mg de cada muestra, se adicionó 1 mL de etanol al 70% y se mezcló en un agitador vórtex.
- Se agregó una gota de la solución de Cloruro férrico (FeCl_3) al 1% y se observó el desarrollo de color.

Técnica extraída de la NOM-003-SAG/GAN-2017

ANEXO 2. DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE FLAVONOIDES.

○ Para propóleo en greña o extracto etanólico:

- Se tomaron 20 mg de cada muestra, se adicionó 1 mL de etanol al 70% y se mezcló en un agitador vórtex.
- Se añadió una gota de NaOH al 20% y se observó el desarrollo de color.

Técnica extraída de la NOM-003-SAG/GAN-2017

ANEXO 3. CUANTIFICACIÓN DE COMPUESTOS FENÓLICOS.

Reacción del ácido gálico para la cuantificación de fenoles totales.

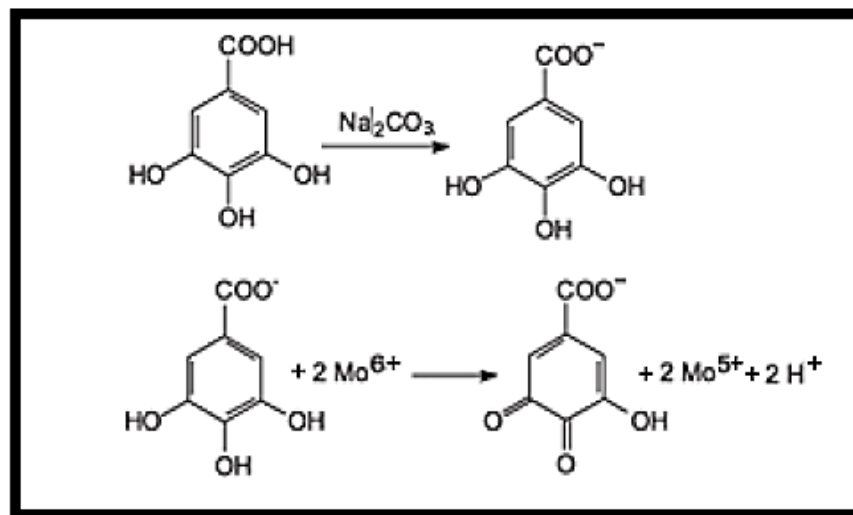


Figura 28. Reacción de óxido-reducción del ácido gálico

- **Preparación de la curva de calibración.**

A partir de una solución estándar de ácido gálico de 0.2 mg/mL, se preparó una curva de calibración como se indica en la tabla:

Tabla 10. Preparación de la curva de calibración para la cuantificación de compuestos fenólicos

	Estándar 1	Estándar 2	Estándar 3	Estándar 4	Estándar 5	Estándar 6
Estándar ácido gálico (μL)	31.25	62.5	125	250	500	1000
Diluyente agua destilada (μL)	968.5	937.5	875	750	500	--
Concentración final (mg /mL)	0.00625	0.0125	0.025	0.05	0.1	0.2
Volumen final	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL

Al tener los sistemas anteriores preparados se realizó lo siguiente:

- Se añadieron a cada sistema 6 mL de agua destilada.
- Se adicionaron 500 μL de reactivo de Folin-Ciocalteu y se dejó reaccionar por 5 minutos.

- Se adicionaron 1.5 mL de carbonato de sodio (NaCO_3) de concentración 200 mg/mL y se aforó a 10 mL con agua destilada.
- Se dejó reaccionar por 2 horas a temperatura ambiente y se leyeron las absorbancias de cada sistema a una longitud de onda de 760 nm.
- Para cada muestra de propóleo, se preparó una concentración de 0.2 mg/mL y se siguió el método descrito.

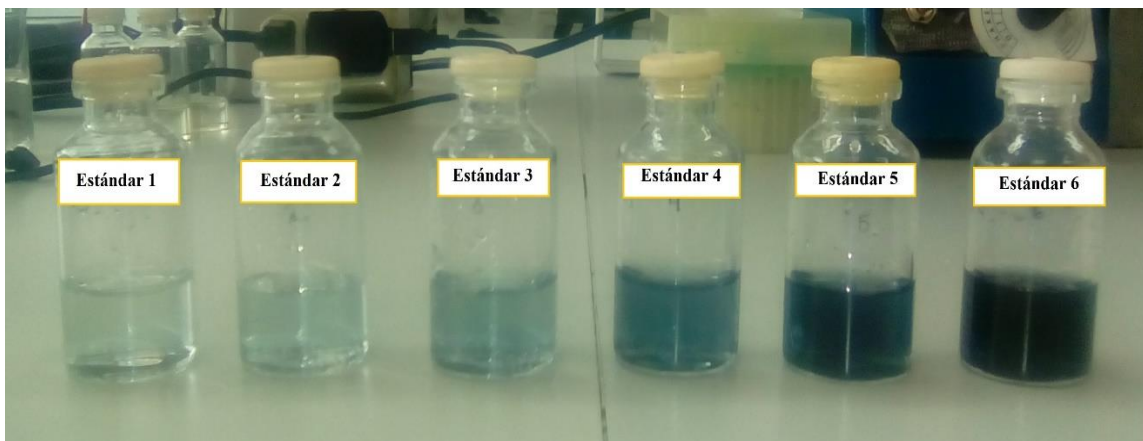


Figura 29. Sistemas para la elaboración de la curva de ácido gálico.

○ Cálculos

Se graficó la concentración de ácido gálico contra la absorbancia, para obtener la curva patrón.

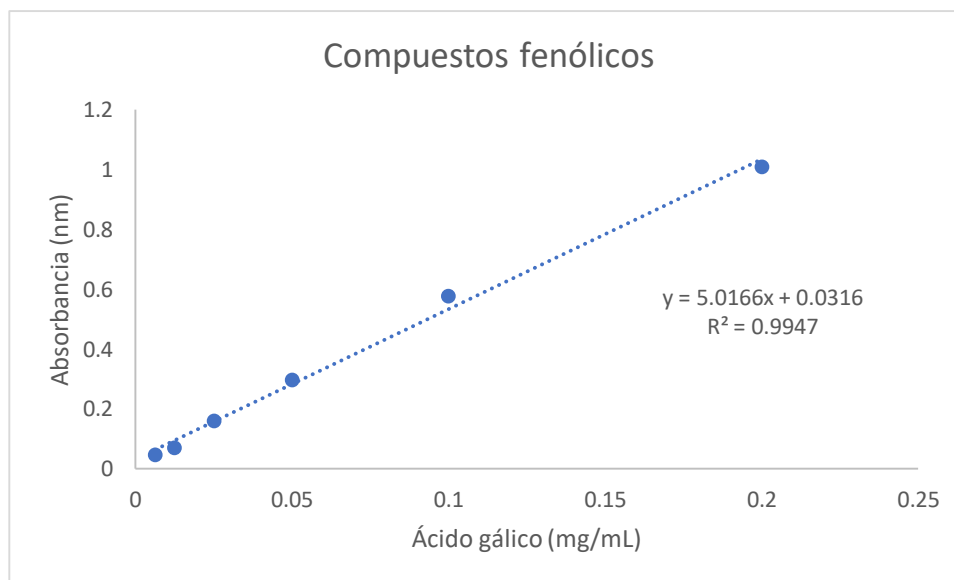


Figura 30. Curva para la cuantificación de compuestos fenólicos.

- Se interpoló la lectura de absorbancia de cada muestra en la curva de calibración
- Los resultados se calcularon de acuerdo a la siguiente fórmula y se reportaron en porcentaje:

$$\frac{\left[\text{Concentración obtenida} \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right) \right] * 100\%}{0.2 \frac{\text{mg}}{\text{mL}}}$$

ANEXO 4. CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES.

Reacción de quercetina con el tricloruro de aluminio

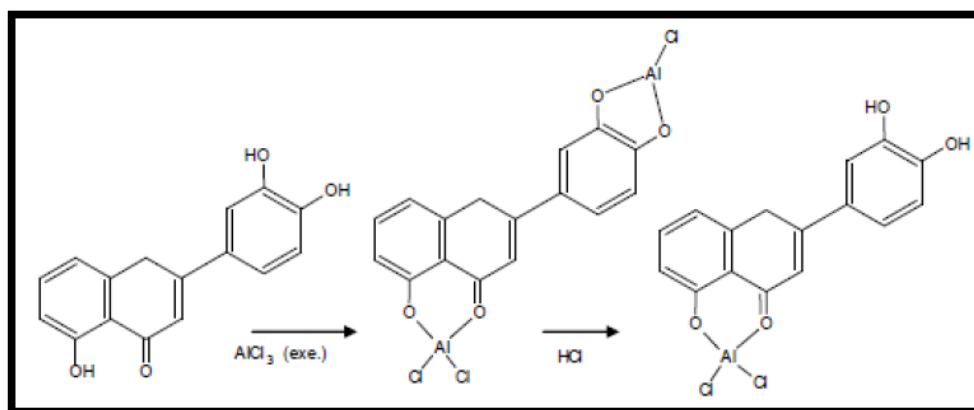


Figura 31. Reacción de quelación del ion Al^{3+} con la quercetina.

○ Preparación de la curva de calibración.

A partir de la solución estándar de quercetina de 1 mg/mL, se tomaron las alícuotas correspondientes para obtener las concentraciones que se muestran a continuación.

Tabla 11. Preparación de la curva de calibración para cuantificación de flavonoides.

Concentración (ug/mL)	Stock de quercetina (μL)	MeOH (μL)	Volumen final
1	3	2997	3 mL
2	6	2994	3 mL
3	9	2991	3 mL
4	12	2988	3 mL
5	15	2985	3 mL
6	18	2982	3 mL
7	21	2979	3 mL
8	24	2976	3 mL
9	27	2973	3 mL
10	30	2970	3 mL
20	60	2940	3 mL
40	120	2880	3 mL
50	150	2850	3 mL

Al tener los sistemas anteriores preparados, se realizó lo siguiente:

- Se adicionaron a cada tubo 3 mL de AlCl_3 al 2%
- Se dejó reaccionar durante 10 minutos y se determinó su absorbancia a una longitud de onda de 415 nm.

- **Cálculos.**

Se graficó la concentración de quercetina contra la absorbancia para obtener la curva patrón.

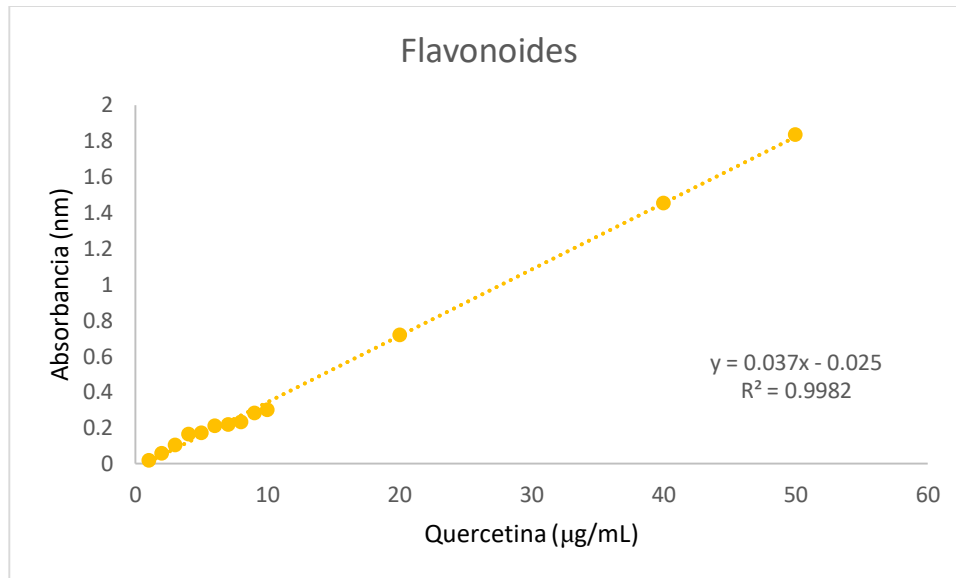


Figura 32. Curva para cuantificación de flavonoides.

- Se interpoló la lectura de absorbancia de cada muestra en la curva de calibración.
- Los resultados se calcularon de acuerdo a la siguiente fórmula y se reportaron en porcentaje:

$$\frac{\left[\text{Concentración obtenida} \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right) \right] * 100\%}{0.05 \text{ mg/mL}}$$

ANEXO 5. PRUEBA DE SENSIBILIDAD BACTERIANA (ANTIBIOGRAMA).

❖ Discos de antibióticos.

Se utilizaron Multidiscos Combinados: 71080380 de papel filtro para el estudio *in vitro* de sensibilidad bacteriana BIO-RAD”

❖ Preparación de reactivos.

Estándar No.0.5 de MacFarland: se añadieron 500 µL de sulfato de bario (BaSO₄) y se aforó a 100 mL de H₂SO₄ al 0.36 N.

Solución Salina Fisiológica 0.85 %: pesar 4.25 g de Cloruro de Sodio (NaCl), se disolvió en 500 mL de agua destilada.

❖ Medio de cultivo.

Agar Müeller-Hinton (MH). Se preparó de acuerdo a las especificaciones del proveedor.

❖ Preparación de la prueba.

Método de suspensión directa de colonias o Kirby-Bauer modificado:

- Se colocaron entre 4 y 5 mL de agua destilada estéril en un tubo de ensayo
- Se tomaron con un asa bacteriológica tres o cuatro colonias morfológicamente similares (partiendo de una muestra clínica siempre se debe realizar un cultivo puro para poder comenzar el estudio de la sensibilidad antibiótica) y se suspendió en el tubo hasta alcanzar una turbidez comparable a la solución de McFarland 0.5
- Se introdujo el hisopo estéril en el inóculo bacteriano preparado, de manera de embeberlo completamente
- Se sembró la placa de MH de manera de obtener un crecimiento confluyente, para lo cual se estría con el hisopo en forma paralela, abarcando toda la superficie de la misma. Se repitió el procedimiento rotando la placa 60° en dos oportunidades más
- Se colocaron los discos con pinza estéril
- Se incubó de 35°C a 37°C
- Después del tiempo de incubación, con un Vernier, se midió el diámetro de los halos de inhibición
- La presencia de un halo de inhibición indica actividad antibacteriana y se reportó el diámetro de los halos de inhibición (en mm)
- La ausencia de halo de inhibición indicó que no existe actividad antibacteriana

Técnica extraída de Taroco, R., Seija, V., R. Vignoli (2006). “Temas de Bacteriología y Virología Médica” Universidad de la República. Facultad de Medicina. Departamento de Bacteriología y Virología Instituto de Higiene. Pág. 663-671.

ANEXO 6. PRUEBA DE DIFUSIÓN EN AGAR.

❖ Preparación de sensidiscos.

Se emplearon discos de papel Whatman No. 5, de 5 mm de diámetro (previamente esterilizados).

Los discos se impregnaron con 10 µL de la solución de EEP (160 mg/100 µL) para que tuvieran una cantidad de 16 mg de EEP y se dejaron secar a temperatura ambiente por 24 horas

❖ Preparación de reactivos.

Estándar No.0.5 de MacFarland: se añadieron 500 µL de sulfato de bario (BaSO₄) y aforar a 100 mL de H₂SO₄ al 0.36 N.

Solución Salina Fisiológica 0.85%: pesar 4.25g de Cloruro de Sodio (NaCl), disolver en 500 mL de agua destilada.

Etanol al 70 %: Se midieron 72.9 mL de alcohol etílico al 96 % y se aforaron a 100 mL con agua destilada.

Solución azul metileno (5 mg/mL): Se pesaron 25 mg de azul metileno y se disolvieron en 5 mL de agua destilada.

❖ Medios de Cultivo.

Para conservación y preparación del inóculo:

Caldo Müeller-Hinton (MH). Se preparó de acuerdo a las especificaciones del proveedor.

Para el método de difusión en agar:

Agar Müeller-Hinton (MH). Se preparó de acuerdo a las especificaciones del proveedor.

Preparación de testigos:

Testigo negativo: se emplearon discos impregnados con 10 µL de etanol al 70%.

❖ Preparación de la prueba.

Preparación de la suspensión de microorganismos:

- Se tomó una asada de las colonias sembradas del microorganismo y se sumergieron en 5 mL de caldo Müeller-Hinton (MH)
- Se enjuagó bien en el líquido y se retiró el asa
- El tubo de cultivo se incubó a 35°C/18 o 24 horas

- Se ajustó la densidad del inóculo de acuerdo al tubo 0.5 del Nefelómetro de MacFarland (aproximadamente 1.5×10^8 UFC/mL) con SSF al 0.85%

Inoculación del microorganismo

- A partir del inóculo con una concentración de $1-5 \times 10^8$ UFC/ mL, se realizó, con un hisopo estéril, un sembrado masivo sobre las placas de agar MH suplementado.
- Con ayuda de una aguja estéril, se colocaron los sensidiscos impregnados de la muestra de los propóleos, procurando dejarlos en el centro de la caja.
- En caso de que se evalúen más de una muestra de propóleo en la misma caja, se recomienda dejar al menos 1.5 cm de distancia entre cada sensidisco y el borde de la caja.
- Se incubó a 35°C / 24 horas.
- Después del tiempo de incubación, con un Vernier, se midió el diámetro de los halos de inhibición.
- La presencia de un halo de inhibición indicó actividad antibacteriana y se reportó el diámetro de los halos de inhibición (en mm).
- La ausencia de halo de inhibición indicó que no existe actividad antibacteriana.

ANEXO 7. Microdilución en caldo para CMI y CMB.

❖ Preparación de reactivos.

Estándar No.0.5 de MacFarland: se añadieron 500 µL de sulfato de bario (BaSO_4) y se aforó a 100 mL de H_2SO_4 al 0.36 N.

Azul de Tetrazolio (TTC) 0.08%: Se pesaron 0.08 g y se disolvieron en 100 mL de agua destilada.

❖ Preparación de la suspensión.

Se realizó la identificación previa de las cepas mediante el sistema VITEK 2, antes de preparar la suspensión.

- Se tomó una asada de la colonia sembrada previamente en MH.
- El tubo de cultivo se incubó a 35°C/24 horas.
- Pasado ese tiempo, se preparó la suspensión a una concentración de aproximadamente 1.5×10^8 UFC/mL, equivalente en turbidez al estándar No. 0.5 de MacFarland

❖ Stock de extracto etanólico de propóleo.

- Se pesaron 32 mg de EEP y se disolvieron en 1 mL de etanol al 70% para obtener una concentración de 32 mg/mL

❖ Preparación de la microplaca.

- Se utilizó una placa de ELISA de 96 pocillos
- Se añadieron 50 µL de caldo MH
- En la fila A, C y E se colocaron las muestras de los tres EEP a evaluar y las filas G y H se utilizaron para los testigos.
- Se añadieron 50 µL de la solución A y fueron colocados en el pocillo A:1
- Se tomaron 50 µL del pocillo A:1 y se transfirió dicho volumen a la siguiente columna (B:1) y así sucesivamente hasta que se llegó a la columna 12 donde se desecharon los últimos 50 µL, con el objetivo de realizar diluciones dobles.

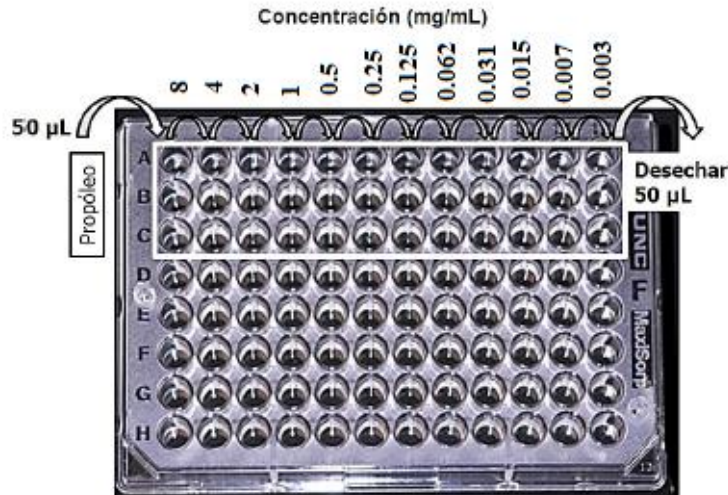


Figura 33. Microplaca de ELISA de 96 pocillos. Técnica de diluciones dobles para determinación de CMI y CMB.

- Se añadieron 50µL de la suspensión bacteriana en todos los pocillos utilizados.
- Se selló con papel parafilm y se incubó a 37°C por 24 horas

❖ **Cálculo de las concentraciones de EEP en la microplaca.**

En la metodología anterior se realizó una serie de diluciones en cada pocillo para obtener una concentración final.

La primera de ellas, fue al agregar 50 µL de la Solución A (EEP de concentración [32 mg/mL]) a 50 µL de caldo MH, obteniendo un volumen final de 100 µL

El cálculo de la concentración es el siguiente:

$$(50\mu\text{L EEP}) \left(\frac{32 \text{ mg}}{1000 \mu\text{L}} \right) \left(\frac{1000 \mu\text{L de disol.}}{100 \mu\text{L de disol.}} \right) = \frac{16 \text{ mg}}{1000 \mu\text{L}}$$

Tras la primera dilución, el pocillo tiene una concentración de 16 mg/mL

Con el fin de realizar diluciones dobles, 50 µL del pocillo A:1 se transfirieron al pocillo A:2, conservando en él, un volumen de 50 µL a los cuales se le adicionaron 50 µL de suspensión bacteriana de forma que

$$(50 \mu\text{L EEP}) \left(\frac{16 \text{ mg}}{1000 \mu\text{L}} \right) \left(\frac{1000 \mu\text{L de disol.}}{100 \mu\text{L de disol.}} \right) = \frac{8 \text{ mg}}{1000 \mu\text{L}}$$

La concentración final del pocillo A:1 es de 8 mg/mL

❖ **Medición de la actividad respiratoria.**

Después de incubar la microplaca

- Se añadieron 50 µL de azul de tetrazolio al 0.08% a cada pozo inoculado, mezclandolo perfectamente, se tapó e incubó a 37°C / 30 minutos
- En los pozos donde hay microorganismos, se observó la disminución en el color y la formación de un botón rojo en el fondo de la concavidad representando la CMI
- Donde no hay desarrollo, la solución permanece clara y representó la CMB

Técnica extraída de Rodríguez, B. (2015). Perfil Químico de Propóleos Mexicanos para su Aplicación en Medicina Veterinaria. Tesis de Maestría en Ciencias. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM.

ANEXO 8. RESULTADO SISTEMA VITEK 2 PARA *Staphylococcus aureus* (1).



LABORATORIOS BIOMEDICOS

Informe de examen

Editado 17-nov-2016 07:21 CST

Editado por: Laboratorio

Nombre del paciente:

Examen: 5-1

Nº paciente:

Tipo de tarjeta: GP Instrumento de análisis: 000015F235A1 (13011)

Bionúmero: 050402062663231

Cantidad de organismo:

Comentarios:	

Información de identificación	Tarjeta: GP	Nº de lote: 2420024123	Fecha caduc.: 20-dic-2017 12:00 CST
	Finalizado: 16-nov-2016 23:43 CST	Estado: Final	Tiempo de análisis: 4,75 horas
Organismo seleccionado	99% Probabilidad <i>Staphylococcus aureus</i>		Nivel de confianza: Identificación excelente
Organismo SRF	Bionúmero: 050402062663231		
Organismos de análisis y pruebas a separar:			
Mensajes análisis:			
Perfil(es) típico(s) contraindicante(s)			

Detalles bioquímicos																	
2	AMY	-	4	PIPLC	-	5	dXYL	-	8	ADH1	+	9	BGAL	-	11	AGLU	+
13	APPA	-	14	CDEX	-	15	AspA	-	16	BGAR	-	17	AMAN	-	19	PHOS	+
20	LeuA	-	23	ProA	-	24	BGURr	-	25	AGAL	-	26	PyrA	+	27	BGUR	-
28	AlaA	-	29	TyrA	-	30	dSOR	-	31	URE	-	32	POLYB	+	37	dGAL	+
38	dRIB	-	39	ILATk	+	42	LAC	-	44	NAG	-	45	dMAL	+	46	BACI	+
47	NOVO	-	50	NC6.5	+	52	dMAN	+	53	dMNE	+	54	MBdG	+	56	PUL	-
57	dRAF	-	58	O129R	+	59	SAL	-	60	SAC	+	62	dTRE	+	63	ADH2s	-
64	OPTO	+															

Versión instalada de VITEK 2 Systems: 07.01

Guía de interpretación de CMI:

Nombre de juego de parámetros de AES:

Guía de interpretación terapéutica:

Última modificación de parámetros de AES:

Tel. 01 800 7153510 . www.biomedicos.com.mx, info@biomedicos.com.mx

Página 1 de 1

ANEXO 9. RESULTADO SISTEMA VITEK 2 PARA *Staphylococcus aureus* (2).



LABORATORIOS BIOMEDICOS

Informe de examen

Editado 17-nov-2016 07:21 CST

Editado por: Laboratorio

Nombre del paciente:
Examen: 6-1

Nº paciente:

Tipo de tarjeta: GP Instrumento de análisis: 000015F235A1 (13011)

Bionúmero: 050402032763231

Cantidad de organismo:

Comentarios:	

Información de identificación	Tarjeta: GP	Nº de lote: 2420024123	Fecha caduc.: 20-dic-2017 12:00 CST
	Finalizado: 16-nov-2016 23:58 CST	Estado: Final	Tiempo de análisis: 5,00 horas
Organismo seleccionado	96% Probabilidad Staphylococcus aureus		Nivel de confianza: Identificación excelente
Organismo SRF	Bionúmero: 050402032763231		
Organismos de análisis y pruebas a separar:			
Mensajes análisis:			
Perfil(es) típico(s) contraindicante(s)			
Staphylococcus aureus URE(2),			

Detalles bioquímicos																	
2	AMY	-	4	PIPLC	-	5	dXYL	-	8	ADH1	+	9	BGAL	-	11	AGLU	+
13	APPA	-	14	CDEX	-	15	AspA	-	16	BGAR	-	17	AMAN	-	19	PHOS	+
20	LeuA	-	23	ProA	-	24	BGURr	-	25	AGAL	-	26	PyrA	+	27	BGUR	-
28	AlaA	-	29	TyrA	-	30	dSOR	-	31	URE	+	32	POLYB	+	37	dGAL	-
38	dRIB	-	39	ILATk	+	42	LAC	-	44	NAG	+	45	dMAL	+	46	BACI	+
47	NOVO	-	50	NC6.5	+	52	dMAN	+	53	dMNE	+	54	MBdG	+	56	PUL	-
57	dRAF	-	58	O129R	+	59	SAL	-	60	SAC	+	62	dTRE	+	63	ADH2s	-
64	OPTO	+															


Versión instalada de VITEK 2 Systems: 07.01
Guía de interpretación de CMI:
Nombre de juego de parámetros de AES:

Guía de interpretación terapéutica:
Última modificación de parámetros de AES:

Tel. 01 800 7153510 . www.biomedicos.com.mx, info@biomedicos.com.mx

Página 1 de 1

ANEXO 10. RESULTADO SISTEMA VITEK 2 PARA *Staphylococcus aureus* (3)



Bio Médicos
NUMERO DE EQUIPO: IMAGEN DIAGNÓSTICA Y LABORATORIO

LABORATORIOS BIOMEDICOS

Informe de examen

Editado 17-nov-2016 07:21 CST
 Editado por: Laboratorio

Nombre del paciente: _____
 Examen: 7-1

Nº paciente: _____

Tipo de tarjeta: GP Instrumento de análisis: 000015F235A1 (13011)

Bionúmero: 030400066263231
 Cantidad de organismo: _____

Comentarios:	

Información de identificación	Tarjeta: GP	Nº de lote: 2420024123	Fecha caduc.: 20-dic-2017 12:00 CST
	Finalizado: 16-nov-2016 23:27 CST	Estado: Final	Tiempo de análisis: 4,50 horas
Organismo seleccionado	99% Probabilidad Staphylococcus aureus		
Organismo SRF	Bionúmero: 030400066263231	Nivel de confianza:	Identificación excelente
Organismos de análisis y pruebas a separar:			
Mensajes análisis:			
Perfil(es) típico(s) contraindicante(s)			

Detalles bioquímicos																	
2	AMY	-	4	PIPLC	-	5	dXYL	-	8	ADH1	+	9	BGAL	+	11	AGLU	-
13	APPA	-	14	CDEX	-	15	AspA	-	16	BGAR	-	17	AMAN	-	19	PHOS	+
20	LeuA	-	23	ProA	-	24	BGURr	-	25	AGAL	-	26	PyrA	-	27	BGUR	-
28	AlaA	-	29	TyrA	-	30	dSOR	-	31	URE	-	32	POLYB	+	37	dGAL	+
38	dRIB	-	39	ILATr	+	42	LAC	+	44	NAG	-	45	dMAL	+	46	BACI	-
47	NOVO	-	50	NC6.5	+	52	dMAN	+	53	dMNE	+	54	MBdG	+	56	PUL	-
57	dRAF	-	58	O129R	+	59	SAL	-	60	SAC	+	62	dTRE	+	63	ADH2s	-
64	OPTO	+															


Versión instalada de VITEK 2 Systems: 07.01
 Guía de interpretación de CMI:
 Nombre de juego de parámetros de AES:

Guía de interpretación terapéutica:
 Última modificación de parámetros de AES:

Tel. 01 800 7153510 . www.biomedicos.com.mx, info@biomedicos.com.mx

Página 1 de 1

ANEXO 11. RESULTADO SISTEMA VITEK 2 PARA *Pseudomonas aeruginosa*.



BioMédicos
EQUIPO Nº: IMAGEN DIAGNÓSTICA Y LABORATORIO

LABORATORIOS BIOMEDICOS

Informe de examen

Editado 17-nov-2016 07:18 CST
Editado por: Laboratorio

Nombre del paciente: _____ N° paciente: _____
Examen: 2-1

Tipo de tarjeta: GN Instrumento de análisis: 000015F235A1 (13011)

Bionúmero: 0043051003500240
Cantidad de organismo: _____

Comentarios:

Información de identificación	Tarjeta: GN	N° de lote: 241388840	Fecha caduc.: 06-ago-2017 13:00 CDT
	Finalizado: 17-nov-2016 01:59 CST	Estado: Final	Tiempo de análisis: 7,00 horas
Organismo seleccionado	97% Probabilidad Pseudomonas aeruginosa		
	Bionúmero: 0043051003500240	Nivel de confianza:	Identificación excelente
Organismo SRF			
Organismos de análisis y pruebas a separar:			
Mensajes análisis:			
Perfil(es) típico(s) contraindicante(s)			
Pseudomonas aeruginosa O129R(86).			

Detalles bioquímicos

2	APPA	-	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	IARL	-	7	dCEL	-	9	BGAL	-
10	H2S	-	11	BNAG	-	12	AGLTp	+	13	dGLU	+	14	GGT	+	15	OFF	-
17	BGLU	-	18	dMAL	-	19	dMAN	-	20	dMNE	+	21	BXYL	-	22	BAlap	+
23	ProA	+	26	LIP	-	27	PLE	-	29	TyrA	-	31	URE	-	32	dSOR	-
33	SAC	-	34	dTAG	-	35	dTRE	-	36	CIT	+	37	MNT	+	39	5KG	-
40	ILATk	+	41	AGLU	-	42	SUCT	+	43	NAGA	-	44	AGAL	-	45	PHOS	-
46	GlyA	-	47	ODC	-	48	LDC	-	53	IHI Sa	-	56	CMT	+	57	BGUR	-
58	O129R	-	59	GGAA	-	61	IMLTa	+	62	ELLM	-	64	ILATa	-			


Versión instalada de VITEK 2 Systems: 07.01
Guía de interpretación de CMI:
Nombre de juego de parámetros de AES:

Guía de interpretación terapéutica:
Última modificación de parámetros de AES:

Tel. 01 800 7153510 . www.biomedicos.com.mx, info@biomedicos.com.mx

Página 1 de 1

ANEXO 12. RESULTADO SISTEMA VITEK 2 PARA *Escherichia coli*.



Bio Médicos
Nombre de equipo: IMAGEN DIAGNÓSTICA
Y LABORATORIO

LABORATORIOS BIOMEDICOS

Informe de examen

Editado 17-nov-2016 07:20 CST
Editado por: Laboratorio

Nombre del paciente: _____ Nº paciente: _____
Examen: 3-1

Tipo de tarjeta: GN Instrumento de análisis: 000015F235A1 (13011)

Bionúmero: 0405610444004610
Cantidad de organismo: _____

Comentarios:

Información de identificación	Tarjeta: GN	N° de lote: 241388840	Fecha caduc.: 06-ago-2017 13:00 CDT
	Finalizado: 16-nov-2016 22:58 CST	Estado: Final	Tiempo de análisis: 4,00 horas
Organismo seleccionado	99% Probabilidad Escherichia coli		Nivel de confianza: Identificación excelente
Organismo SRF	Bionúmero: 0405610444004610		
Organismos de análisis y pruebas a separar:			
Mensajes análisis:			
Perfil(es) típico(s) contraindicante(s)			

Detalles bioquímicos

2	APPA	-	3	ADO	-	4	PyrA	-	5	IARL	-	7	dCEL	-	9	BGAL	+
10	H2S	-	11	BNAG	-	12	AGLTp	-	13	dGLU	+	14	GGT	-	15	OFF	+
17	BGLU	-	18	dMAL	+	19	dMAN	+	20	dMNE	+	21	BXYL	-	22	BAlap	-
23	ProA	-	26	LIP	-	27	PLE	-	29	TyrA	-	31	URE	-	32	dSOR	+
33	SAC	-	34	dTAG	-	35	dTRE	+	36	CIT	-	37	MNT	-	39	5KG	+
40	ILATk	-	41	AGLU	-	42	SUCT	-	43	NAGA	-	44	AGAL	-	45	PHOS	-
46	GlyA	-	47	ODC	-	48	LDC	+	53	IHISa	-	56	CMT	+	57	BGUR	+
58	O129R	+	59	GGAA	-	61	IMLTa	-	62	ELLM	-	64	ILATa	-			

Versión instalada de VITEK 2 Systems: 07.01
Guía de interpretación de CMI:
Nombre de juego de parámetros de AES:

Guía de interpretación terapéutica:
Última modificación de parámetros de AES:

Tel. 01 800 7153510 . www.biomedicos.com.mx, info@biomedicos.com.mx

Página 1 de 1

ANEXO 13. INSERTO Multidiscos Combinados: 71080380 de papel filtro para el estudio *in vitro* de sensibilidad bacteriana BIO-RAD.

TABLA 1
Diámetro de halo de inhibición en mm

Agente Antimicrobiano	Contenido del disco	R	I	S
Amikacina	Enterobacteriaceae 30 µg	≤ 14	15-16	≥ 17
Ampicilina	10 µg			
	Enterobacteriaceae	≤ 13	14-16	≥ 17
	Staphylococcus spp	≤ 28	-	≥ 29
	Enterococcus spp	≤ 16	-	≥ 17
	Streptococcus spp	-	-	≥ 24
Carbencilina	100 µg			
	Enterobacteriaceae	≤ 19	20-22	≥ 23
	Pseudomonas aeruginosa	≤ 13	14-16	≥ 17
Cefalotina	Enterobacteriaceae 30 µg	≤ 14	15-17	≥ 18
Cefepime	" 30 µg	≤ 14	15-17	≥ 18
Cefotaxima	" 30 µg	≤ 14	15-22	≥ 23
Ceftazidima	" 30 µg	≤ 14	15-17	≥ 18
Ceftriaxona	" 30 µg	≤ 13	14-20	≥ 21
Cefuroxima	" 30 µg	≤ 14	15-22	≥ 23
Cloranfenicol	" 30 µg	≤ 12	13-17	≥ 18
Dicloxacilina	1 µg			
	Staphylococcus spp	≤ 10	11-12	≥ 13
Enoxacina	Enterobacteriaceae 10 µg	≤ 14	15-17	≥ 18
Eritromicina	15 µg			
	Enterococcus spp	≤ 13	14-22	≥ 23
Gentamicina	Enterobacteriaceae 10 µg	≤ 12	13-14	≥ 15
Levofloxacina	" 5 µg	≤ 13	14-16	≥ 17
Netilmicina	" 30 µg	≤ 12	13-14	≥ 15
Nitrofurantoina	" 303 µg	≤ 14	15-16	≥ 17
Pefloxacina	5 µg	≤ 14	15-22	≥ 23
Penicilina	10 U			
Ampicilina	10 µg			
	Staphylococcus spp	≤ 28	-	≥ 29
	Enterococcus spp	≤ 14	-	≥ 15
	N. gonorrhoeae	≤ 26	27-46	≥ 47
	Streptococcus spp	-	-	≥ 24
Tetracidina	Enterobacteriaceae 30 µg	≤ 14	15-18	≥ 19
Trimetoprim-Sulfametoxazol	25 µg	≤ 10	11-15	≥ 16

R= Resistente I= Intermedio S= Sensible

11. REFERENCIAS.

1. Acosta-Gnass, S. (2005). "Enterococcus". Control de Infecciones y Epidemiología. <https://codeinep.org/wp-content/uploads/2017/02/Enterococcus.pdf> consultado el 28 de Septiembre del 2018.
2. Adanero, F. (2000). Curso para Diplomado en Sanidad Animal. Ed. Soria.
3. Ahn, M., Kunimasa, K., Ohta, T. (2007). Suppression of tumor induced angiogenesis by Brazilian propolis: major component artepillin C inhibits *in vitro* tube formation and endothelial cell proliferation. *Cáncer letters*, 252: 2354- 243.
4. Alba, F. (2013). Análisis retrospectivo y prospectivo del desarrollo de la Resistencia Bacteriana. Tesis de Licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM.
5. Anaya, A., Espinosa, F. (2006). La Química que entreteje a los seres vivos. *Ciencia*, 83:4-13.
6. Asis, M. (2001). Apiterapia para todos. Cómo usar los siete productos de la colmena para curar. Ed. Científico Técnica. México. pp 60-96.
7. Bankova, V., De Castro, S., Marcucci, M. (2000). Propolis: Recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*. 31:3-15.
8. Bankova, V., Popov, S., Marekov, N. (1983). A study of flavonoids of propolis. *Journal of Natural Products*, 46:471-474.
9. Bankova, V., Popova, M., Tsusheva, B., Bogdanov, S., Sabatini, A. G., Marcucci, M., (2007). Propolis: from folk medicine to modern preparations. *Mitsubachi Kagaku* 27: 63-70.
10. Banskota, A., Nagaoka, T., Sumioka, L., Tezuka, Y., Awale, S., Midorikawa, K., Matsushige, K., Kadota, S. (2002). Antiproliferative activity of the Netherlands 84 propolis and its active principles in cancer cell lines. *Journal of Ethnopharmacology*, 80:67-73.
11. Bhardwaj, S., Bhamre, K., Dhawale, J., Patil, M., Divase, M. (2013). *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*, the nosocomial pathogens with special reference to multi-drug resistance and phenotypic characterization. *International Journal of Pharmaceutical Science and Practice*. 2:1-10.
12. Biblioteca Digital de las Plantas Medicinales de México, 2012. <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/presenta.html> consultada el 2 de abril del 2018.
13. Bogdanov, S. (2012). Propolis: Composition, Health, Medicine: A Review. <http://www.bee-hexagon.net/> consultado el 2 de abril del 2018.
14. Boisard, S., Le Ray, A., Gatto, J., Aumond, M., Blanchard, P., Derbre, S., Flurin, C., Richomme, P. (2014). Chemical Composition, Antioxidant and Anti-AGEs Activities of a Frech Poplar Type Propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62:1344-1351.
15. Boucher, H., Talbot, G., Bradley, J., Edwards, J., Gilbert, D., Rice, L., Scheld, M., Spellberg, B., Bartlett, J. (2009). Bad Bugs, No Drugs: No ESKAPE! An Update from the Infectious Diseases Society of America. *IDSA Report on Development Pipeline*. 48: 1-12.
16. Bustos, J., Hamdan, A., Gutiérrez, M. (2006). "Staphylococcus aureus: la reemergencia de un patógeno en la comunidad". 1 Depto. de Atención a la Salud, 2 Depto. de Sistemas Biológicos. Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco. *Rev. Biomed.* 17:287-305.
17. Camacho G. (2013). Programas de uso prudente de antibióticos en los hospitales: una estrategia efectiva para disminuir la resistencia a los antimicrobianos. *Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría*. 26(104): 282.
18. Castro, A. (2014). Bacteriología Médica basada en problemas. Segunda Edición. Editorial El manual moderno.
19. Chaillou, L. (2005). Propóleos de Santiago del Estero. Características físicas y químicas. Actividad antibacteriana y antioxidante. Identificación y cuantificación de flavonoides. Tesis

- Doctoral. Facultad de Agronomía y Agroindustrias. Universidad Nacional de Santiago del Estero, Argentina.
20. Chaillou, L., Herrera, H., Maidana, J. (2004). Estudio de propóleos de Santiago del Estero, Argentina. *Food Science and Technology (Campinas)* 24, 11-15.
 21. Chang, J., Young, B., Ho Jae, L., Hwan, S. (2003). Chemical components of propolis and its ethanolic extracts. *Han'guk Sikp'um Yongyang Kwahak Hoechi*, 32:501-505.
 22. Choi, Y., Noh, D., Cho, S., Suh, H., Kim, K., Kim, J. (2006). Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. *Food Sci. Technol.* 39: 756- 761.
 23. Christov, R., Bankova, V., Tsvetkova, I., Kujumgiev, A., Delgado-Tejera, A. (1999). Antibacterial furofuran lignans from Canary Island propolis. *Fitoterapia*, 70:89-92.
 24. CONABIO y UAEM. 2004. La Diversidad Biológica en Morelos: Estudio del Estado. Contreras-MacBeath, T., J.C. Boyás, F. Jaramillo (editores). Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad y Universidad Autónoma del Estado de Morelos. México. https://www.biodiversidad.gob.mx/region/EEB/pdf/EE_Morelos_2006.pdf consultado el 14 de agosto del 2018.
 25. Decré, D., Verdet, C., Emirian, A., Le Gourrierc, T., Petit, JC., Offenstadt, G., Maury, E., Brisse, S., Arlet, G. (2011). Emerging Severe and Fatal Infections Due to *Klebsiella pneumoniae* in Two University Hospitals in France. *Journal of Microbiology Clinical*. 49: 3011-3014.
 26. Díaz, Marilyn., Rodríguez, Claudio., Zhurbenko, Raisa (2010). "Aspectos fundamentales sobre el género *Enterococcus* como patógeno de elevada importancia en la actualidad". *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*. 48: 147-161.
 27. Díaz, V. (2010). *Acinetobacter baumannii*: actualidades. *Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría*. 23:104-105.
 28. Dimov, V., Ivanoska, N., Manolova, N., Nikolov, N., Popov, S. (1991). Immunomodulatory action of propolis. Influence on anti infection and macrophage function. *Apidologie*. 22: 155-162.
 29. Echeverri, L. y Cataño, J. (2010). *Klebsiella pneumoniae* como patógeno intrahospitalario: epidemiología y Resistencia. *IATREIA* 23:240-249.
 30. El Hady F., Hegazi A. (2002). Egyptian propolis: 2. Chemical composition, antiviral and antimicrobial activities of east Nile delta propolis. *Z. Naturforsch.*, 57:386-394.
 31. Estrada, P. (2012). Evaluación in vitro del efecto del propóleo sobre *Microsporum canis*. Tesis de Licenciatura, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.
 32. Falçao, S., Vilas-Boas, M., Estevinho, L., Barros, C., Domingues, M., Cardoso, S. (2010). Phenolic characterization of Northeast Portuguese propolis: usual and unusual compounds. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 396: 889-897.
 33. Farooqui, T., Farooqui, A. (2010). Molecular Mechanism Underlying the Therapeutic Activities of Propolis: A Critical Review. *Curr Nutr Food Sci* 6: 188-199.
 34. Farooqui, T., Farooqui, A. (2012). Beneficial effects of propolis on human health and neurological diseases. *Frontiers in Bioscience*, E4: 774-793.
 35. Farré, R., Frasset I., Sánchez A. (2004). El propolis y la Salud. *Ars Pharm* 45:23-43.
 36. FAO: Food and Agriculture Organization of the United Nations (2007). Value-added products from beekeeping. Capítulo 5. <http://www.fao.org/docrep/w0076e/w0076e14.htm> consultado el 12 de junio de 2018.
 37. Fazeli, H., Akbari, R., Moghim, S., Narimani, T., Arabestani, M., Ghoddousi, A. (2012). *Journal of Research in Medical Sciences*. 17:332-337.
 38. Galí, Z. (2010). Enterobacterias. *Antibioticoterapia*. APUA. Alliance for the Prudent Use of Antibiotics. www.sld.cu/galerias/doc/sitios/.../enterobacterias_y_antibioticoterapia Consultado el 28 de agosto de 2018.
 39. García, A., Pérez- Urría, E., (2009). Metabolismo Secundario de Plantas. *Raduca (Biología)*. Serie Fisiología Vegetal. 2(3): 199-145.

40. Geissman, T. (1974). Principios de Química Orgánica. España: Reveté.
41. Gimeno, E. (2004). Compuestos fenólicos: Un análisis para sus beneficios a la salud. *Ámbito farmacéutico. Nutrición*. 23: 80-84.
42. González, A. (1997). Propóleos: un camino hacia la salud. La Habana, Cuba: Pablo de la Torriente.
43. Guerrero, J. (2013). Estudio químico del propóleo negro de la región de Zacatecas. Tesis de Maestría en Ciencias Químicas. UNAM. México.
44. Gutiérrez, E. (2011). Actividad antibacteriana y perfil químico de propóleos mexicanos sobre cepas de *Pasteurella Multocida* aisladas de conejos. Tesis de Maestría. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, México.
45. Gutiérrez, F., Cacho, B., García, G. (2010). "Enterococcus faecium, agente etiológico de meningitis bacteriana aguda: caso reporte y revisión de la literatura". *Revista Mexicana de Neurociencia*. 11: 107-110.
46. Hernández, A., García, E., Yagüe, G., Gómez, J. (2010). "Acinetobacter baumannii multirresistente: situación clínica actual y nuevas perspectivas". *Rev Esp Quimioter*. 23:12-19.
47. Hernández, C., Aguilera, M., Castro, G. (2011). Situación de las enfermedades gastrointestinales en México. *enfermedades Infecciosas y Microbiología*. 31: 137-151.
48. Hernández, G., Cabrera, G., Fernández, M., González, F., Silva, M., Caldera, J., Pitteloud, J., (2010) . Frecuencia y resistencia bacteriana de *Staphylococcus aureus* en infecciones nosocomiales en el Hospital Universitario de Caracas, años 2004 y 2007. *Ciencia e Investigación Médica Estudiantil Latinoamericana*. 15:28.
49. INEGI, (2009). Censo Agrícola, Ganadero y Forestal 2007. <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/tabuladosbasicos/default.aspx?c=17177&s=est> consultado el 4 de abril del 2018.
50. Jean-Prost, P., Le Conte J. (2007). Apicultura: conocimiento de la abeja, manejo de la colmena. (4 ed.). Madrid: Mundi-Prensa.
51. Kocsis, B. (2014). "*Staphylococci and Streptococci*". Semmelweis University Institute of Medical Microbiology. http://semmelweis.hu/mikrobiologia/files/2014/10/FGM_06.pdf consultado el 28 de Septiembre del 2018.
52. Koo, H., Rosalen, P., Cury, J., Park, Y. (2002). Effects of compounds Found in Propolis on *Streptococcus mutans* Growth and on Glucosyltransferase Activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 46:1302.
53. Kosalec, I., Bakmaz, M., Pepelnjak, S., Knezevic, S. (2007). Quantitative analysis of the flavonoids in raw propolis from northern Croatia. *Acta Pharmaceutica Nordica*, 54:65-72.
54. Kumazawa, S., Hamasaka, T., Nakayama, T. (2004). Antioxidant Properties and Phenolic Composition of Greek Propolis Extracts. *Internacional Journal of Food Properties* 17(3): 511-522.
55. Kuropatnicki, A., Szliszka, E., Krol, W. (2013). Historical aspects of propolis research in modern times. *Evidence- based complementary and alternative medicine*. 1:11.
56. Lima, B., Tapia, A., Luna, L., Fabani, M., Schmeda- Hirschmann, G., Podio, N., Wunderlin, D., Feresin, G. (2009). Main Flavonoids, DPPH Activity, and Metal Content Allow Determination of Geographical Origin of Propolis from the Province of San Juan (Argentina). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57:2691-2698.
57. Lagouri, V., Prasianaki, D., Krysta, F. (2014). Antioxidant Properties and Phenolic Composition of Greek Propolis Extracts. *International Journal of Food Properties*, 17(3):511-522.
58. León, V. (2012). Estudio químico de un propóleo recolectado en la zona rural del Distrito Federal. Evaluación de su actividad antibacteriana contra bacterias patógenas orales. Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México.
59. López, J. y Echeverri, L. (2010). "K. pneumoniae: ¿la nueva "superbacteria"? Patogenicidad, epidemiología y mecanismos de resistencia.

<http://www.scielo.org.co/pdf/iat/v23n2/v23n2a7.pdf> consultado el 28 de Septiembre del 2018.

60. Luo, Z., Dong, J., Zhao, L., Zhang, H. (2013). Analysis of polyphenolics in propolis from Henan province. *Shipin Kexue* (Beijing, China), 34:139-143.
61. Magiorakos, A.P., Srinivasan A., Carey R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D. L. , Rice, L. B., Stelling, J., Struelens, M. J., Vatopoulos, A., Weber, J. T. and Monnet, D. L. (2011). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18: 268–281
62. Marcucci, M. (1995). Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*. 26:83-99.
63. Marcucci, M., Ferreres, F., Gracia-Viguera C., Bankova, V., De Castro, S., Dantas, A. (2001). Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *J Ethnopharmacol*. 74: 105-112.
64. Marghitas, L., Laslo, L., Dezmirean, D., Moise A., Maghear, O. (2013). Total phenolic and antioxidant activity of Romanian propolis, International Conference Agricultural and Food Sciences, Progresses and Technologies, Sibiu, Rumania.
65. Markham, K., Mitchel, K., Wilkins, A., Daldy, J., Lu, Y. (1996). HPLC and GC-MS identification of the major organic constituents in New Zeland propolis. *Phytochemistry*, 42:205-211.
66. Martínez, S., González, J., Tuñón, M. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Revisión. Nutr. Hosp* 8: 271-278.
67. Mendoza, A. (2011). El formidable reto de la resistencia bacteriana a los antibióticos. *Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM*. 54: 18-27.
68. Mensa, J., Soriano, A., Linares, P., Barberán, J., Montejo, M., Salavert, M., Alvarez-Rocha, L., Maseda. E., Moreno, A., Pasquau, J., Gómez, J., Parra, J., Candel, J., Azanza, J., García, J., Marco, F., Soy, D., Grau, S., Arias, J., Fortún, J., Aristides, C. (2013). "Guía de tratamiento antimicrobiano de la infección por *Staphylococcus aureus*". *Rev. Española Quimioter*. 26:1-84.
69. Mesaros, N., Nordmann, P., Plésiat, P., Roussel-Delvallez, M., Van Eldere, J., Glupczynski, Y., Van Laethem, Y., Jacobs, F., Lebecque, P., Malfroot, A., Tulkens, P., Van Bambeke, F. (2007). *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. *Clinical Microbiology and Infection*. CMI. 13: 560-578.
70. Mirzoeva., O., Grishanin, R., Calder, P. (1997). Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. *Microbiology Research*: 152:239-246
71. NORMA Oficial Mexicana NOM-003-SAG/GAN-2017, Propóleos, producción y especificaciones para su procesamiento.
72. Paganelli, F., Willems, R., Jansen, P., Hendrickx, A., Zhang, X., Bonten, M., Leavis, H. (2013). *Enterococcus faecium* Biofilm Formation: Identification of Major Autolysin AtlAEfm, Associated Acm Surface Localization, and AtlA Efm- Independent Extracellular DNA Release. *mBio*. 4(2):1-10.
73. Palacios, N. y Pérez, A. (2016). Análisis Químico de una muestra de propóleo recolectada en Chihuahua, México. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM.
74. Palomino, G. Lady R., García, P. (2009). Determinación del contenido de fenoles y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos recolectados en el Departamento de Antioquía (Colombia). *Vitae* 16 (3): 388-395.
75. Papotti, G., Bertelli, D., Bortolotti, L., Plessi M. (2012). Chemical and functional characterization of Italian propolis obtained by different harvesting methods. *J. Agricultural Food Chemistry* . 60: 2852-2862.

76. Piccinelli, A., Mencherini, T., Celano, R., Mouhoubi, Z., Tamendjari, A., Aquino, R., Rastelli, L. (2013). Chemical Composition and Antioxidant Activity of Algerian Propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61:5080-5088.
77. Popova, M., Bankova, V., Bogdanov, S., Tsvetkova, I., Naydenski, C., Marcazzan, G., Sabatini, A. (2007). Chemical characteristics of poplar type propolis of different geographic origin. *Apidologie*, 38:306-31
78. Rice, L. (2010). Progress and Challenges in Implementing the Research on ESKAPE Pathogen. *Infection control and hospital epidemiology*. 31:7-10.
79. Ríos, J., Recio, M., Villar, A. (1998). Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of literatura. *Journal of Ethnopharmacology*. 23:127-149
80. Robeiro, L., Salvadori, D. (2003). Dietary components may prevent mutation-related diseases in human. *Mutation Research-Reviews in Mutation Research* 544 (2-3): 195-201.
81. Rodríguez, B. (2015). Perfil Químico de Propóleos Mexicanos para su Aplicación en Medicina Veterinaria. Tesis de Maestría en Ciencias. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM.
82. Rodríguez, E., León, G., Peterson, S., Pérez, H., González, E., Morfín, R. (2014). La evolución de la resistencia bacteriana en México, 1973-2013. *Biomédica*. 34: 181-190.
83. Salamanca, G., Correa, I. (2007). Perfil de flavonoides e índices de oxidación de algunos propóleos colombianos. *Zootecnia trop*. 25(2): 95-102.
84. Salatino, A., Fernandes-Silva, C., Righi, A., Salatino, M.(2011). Propolis research and the chemistry of plants products. *Natural Products Reports*. 28:925-936.
85. Salatino, A., Teixeira, E., Negri, G., Message, D. (2005). Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. Journal Natural Products Reports*, 2:33-38.
86. Sava, I., Heikens, E., Huebner, J. (2010). Pathogenesis and immunity in enterococcal infections. *Clinical microbiology and infection*. 16:533–540.
87. Secretaría del Medio Ambiente, 2008. http://sma.edomex.gob.mx/sites/sma.edomex.gob.mx/files/files/sma_pdf_flora_fauna_em.pdf consultado el 14 de agosto del 2018.
88. Sforcin, J., Bankova V., (2011). Propolis: is there a potential for the development of new drugs? *Journal of Ethnopharmacology* 133, 253-260.
89. Shaheen, S., Abu-Zarga, M., Nazer, I., Darwish, R., Hala, I., (2011). Chemical constituents of Jordian propolis. *Natural Product Research, Formerly Natural Product Letters*, 25:1312-1318.
90. Takaisi-Kikuni, N., Schilcher, H. (1994). Electron microscopic and microcalorimetric investigations of the posible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance. *Planta Médica*. 60:222-227
91. Técnica extraída de Taroco R., Seija, V., Vignoli R.(2006). “Temas de Bacteriología y Virología Médica” Universidad de la República. Facultad de Medicina. Departamento de Bacteriología y Virología Instituto de Higiene. Pág. 663-671.
92. Vahdani, P., Yaghoubi, T., Aminzadeh, Z. (2011). Hospital Acquired Antibiotic Resistant *Acinetobacter Baumannii* Infections in a 400-Bed Hospital in Tehran, Iran. *International Journal of Preventive Medicine*. 2:127–130.
93. Vallés, J. y Mariscal, D. (2005). Neumonía por *Pseudomonas aeruginosa*. *Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica*. 23:30-36.
94. Valencia, D., Alday, E., Robles-Zepeda, R., Garibay-Escobar, A., Gálvez-Ruiz, J., Salas-Reyes, M., Jimenez-Estrada, M., Velázquez-Contreras, E., Hernández, J., Velázquez, C. (2012). Seasonal effect on chemical composition and biological activities of Sonoran propolis. *Food Chemistry*, 131:645-651.
95. Vargas, R., Torrescano, G., Mendoza, A., Vallejo, V., Acedo, E., Sánchez, J., Peñalba, M., Sánchez, A. (2014). Mecanismos involucrados en la actividad antioxidante y antibacteriana del propóleo. *Biotecnia*. 1:32-37

96. Vilchis, S (2016). Desarrollo de una prueba de campo para detección de fenoles y flavonoides en propóleos mexicanos. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM.
97. Volpi, N., Bergonzini, G., (2006). Analysis of flavonoids from propolis by on-line HPLC electrospray mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 42:354-361.
98. Zeiger, E. (2006). *Fisiología Vegetal* (3a ed.). California: Universidad Jaume