

# UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS E INGENIERÍA  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS Y  
AGROPECUARIAS

“Evaluación *in vitro* de la Actividad Antibacteriana de  
Propóleos Sonorenses en Aislados Clínicos de *Staphylococcus*  
*aureus* y *Enterococcus spp*”

TESIS PROFESIONAL

Que para obtener el título de:

QUÍMICO BIÓLOGO CLÍNICO

Presente:

KARLA ROCÍO ARCE CALVARIO

H. CABORCA, SONORA

DICIEMBRE DE 2011

# Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos  
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

## **APROBACIÓN**

Los miembros del jurado designado para evaluar la Tesis Profesional de Karla Rocío Arce Calvario, la han encontrado satisfactoria y recomiendan sea aceptada como requisito parcial para obtener el título de Químico Biólogo Clínico.

---

M.C. Ramón Efraín Lugo Sepúlveda  
Presidente

---

M.C. María del Carmen García Moraga  
Secretaria

---

M.C. Moisés Navarro Navarro  
Vocal

---

Q.B. Rafael de la Rosa López  
Suplente

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Investigación del Departamento de Ciencias Químico Biológicas, de la Universidad de Sonora, Unidad Regional Norte, Campus Caborca y en colaboración con el Laboratorio del Cuerpo Académico de Biología y Bioquímica (CABB), de la Universidad de Sonora, Unidad Centro.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios a quien no acabo de entender.

A mi Alma Mater, la Universidad de Sonora, por abrirme sus puertas y ser hoy un espacio en mi formación académica.

Un especial agradecimiento a mi director de tesis el M.C. Ramón Efraín Lugo Sepúlveda por su ayuda, guía, interés, apoyo, y sobre todo paciencia durante el desarrollo de este trabajo de investigación.

Al M.C. Moisés Navarro Navarro por su valiosa orientación en el desarrollo de la metodología de trabajo en la evaluación de la actividad antibacteriana. Además de formar parte del comité revisor.

A mis sinodales Q.B. Rafael de la Rosa López y M.C. María del Carmen García Moraga, por su valioso apoyo, sus observaciones y sugerencias atinadas para mejorar la calidad del presente trabajo y por formar parte del comité revisor.

Al Dr. Juan Antonio Noriega Rodríguez, por su colaboración con el Laboratorio de Investigación de la Universidad de Sonora, Unidad Regional Norte para la realización del extracto metanólico y sus fracciones.

A la M.C. Martha Judith Valdez Ortega, directora del Laboratorio del Cuerpo Académico de Biología y Bioquímica (CABB), de la Universidad de

Sonora, Unidad Centro, por permitir llevar a cabo la realización de la evaluación antibacteriana en dichas instalaciones.

A los integrantes del grupo CABB, por su orientación en cada paso que di dentro del Laboratorio así como en el uso de los equipos.

A todos los Profesores y Profesoras que fueron parte de mi formación tanto profesional como personal, gracias por compartirme sus conocimientos y brindarme su apoyo incondicional y desinteresado.

## **DEDICATORIA**

Con cariño, respeto y admiración a la memoria de mi abuela Francisca González (Q.D.E.P), por su ejemplo de vida, por brindarme los mejores momentos de mi infancia y hacerme saber que no hay límites para alcanzar mis metas.

A mis Padres, Luis Arce Sabori y Justina Calvario González, por sus esfuerzos y sacrificios realizados para darme la oportunidad de realizar mis estudios profesionales

A mis hermanos, Luis y Ana.

A mi pareja, Yoshio, por acompañarme durante estos últimos 6 años aún sin estar presente, por todo el amor, apoyo y comprensión que me has brindado.

A mi hermosa hija, Yaritza, que se ha convertido en mi razón de vivir, en la luz que me impulsa y motiva a seguir adelante.

## ÍNDICE

Contenido	Página
ÍNDICE	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE TABLAS	v
ABREVIATURAS	vi
RESUMEN	vii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. LITERATURA REVISADA	7
2.1. Propóleos	7
2.1.1. Recolección de los propóleos trabajados por las abejas	8
2.1.2. Antecedentes históricos	9
2.1.3. Procedencia de su composición y origen botánico	11
2.1.4. Propóleos de zonas templadas	13
2.1.5. Propóleos de zonas tropicales	15
2.1.6. Propóleos de Sonora	15
2.1.7. Acción biológica de los propóleos	17
2.1.8. Propiedades antimicrobianas	20
2.1.9. Estudios realizados sobre propóleos	21
2.1.9.1. Propóleos sonorenses	22
2.2. Antibióticoterapia	23
2.1.1. Resistencia a los antibióticos	23
2.3. <i>Staphylococcus aureus</i>	24
2.4. <i>Enterococcus spp</i>	25
3. OBJETIVOS	28



4. PARTE EXPERIMENTAL	29
4.1. Muestra de propóleos	29
4.2. Extracto metanólico (EM)	29
4.2.1. Partición del EM	31
4.3. Determinación de la actividad antibacteriana	31
4.3.1. Soluciones concentradas y de trabajo	32
4.3.2. Cepas bacterianas	32
4.3.3. Inóculo bacteriano	32
4.3.4. Evaluación de la actividad antibacteriana	34
4.3.5. Determinación de la CMI	34
4.4. Análisis estadístico	35
5. RESULTADOS Y DISCUSIONES	36
6. CONCLUSIONES	46
7. RECOMENDACIONES	47
8. BIBLIOGRAFÍA	48
9. APÉNDICE	58
9.1. Preparación de la solución concentrada y de las soluciones de trabajo del EM	58
9.2. Preparación de la solución concentrada y de las soluciones de trabajo de la FH	61
9.3. Preparación de la solución concentrada y de las soluciones de trabajo de la FC	64
9.4. Preparación de la solución concentrada y de las soluciones de trabajo de la FMR	67

9.5. Preparación de las soluciones de trabajo de gentamicina	70
9.6. Distribución de las muestras para la preparación de las soluciones de trabajo en placa de 12 pozos del EM, FC y FH	72
9.7. Distribución de las muestras para la preparación de las soluciones de trabajo en placa de 12 pozos del FMR	73
9.8. Distribución de las muestras (EM, FC y FH) en la placa de 96 pozos de fondo plano	74
9.9. Distribución de las muestras (FMR) en la placa de 96 pozos de fondo plano	75

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
1. Abejas <i>Apis mellifera</i> colectando y elaborando el propóleos	10
2. Estructura química de los compuestos aislados de propóleos de zonas templadas	14
3. Estructura química de los compuestos aislados de propóleos de zonas tropicales	16
4. Estructura química de los compuestos aislados de propóleos de Ures, Sonora	18
5. Ubicación geográfica de la región El Arenoso	30
6. Actividad antibacteriana del EM, FH, FC y FMR frente al cultivo de <i>S. aureus</i> ATCC6538P	38
7. Actividad antibacteriana del EM, FH, FC y FMR frente al cultivo de <i>S. aureus</i> 157	39
8. Actividad antibacteriana del EM, FH, FC y FMR frente al cultivo de <i>E. faecalis</i> 132	40
9. Actividad antibacteriana del EM, FH, FC y FMR frente al cultivo de <i>E. faecalis</i> 531	41

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
1. Composición promedio de los propóleos	12
2. Principales compuestos presentes e identificados por HPLC-MS en propóleos sonorenses	19
3. Características de las cepas clínicas	33
4. Concentración mínima inhibitoria 90% (CMI <sub>90</sub> ) del EM, FH, FC y FMR frente a las cepas de <i>S. aureus</i> ATCC6538P, <i>S. aureus</i> 157, <i>E. faecalis</i> 132 y <i>E. faecalis</i> 531	42
5. Porcentaje de Inhibición del desarrollo de la cepa de <i>S. aureus</i> ATCC6538P, <i>S. aureus</i> 157, <i>E. faecalis</i> 132 y <i>E. faecalis</i> 531 frente a diferentes concentraciones del EM a las 24 horas de incubación	43
6. Porcentaje de Inhibición del desarrollo de la cepa de <i>S. aureus</i> ATCC6538P, <i>S. aureus</i> 157, <i>E. faecalis</i> 132 y <i>E. faecalis</i> 531 frente a diferentes concentraciones del FC a las 24 horas de incubación	44
7. Informes de concentración mínima inhibitoria (CMI) de propóleos de distintas regiones	45

## ABREVIATURAS

AMH	Agar Mueller Hinton
ATCC	American Type Culture Collection
CAPE	Éster fenílico del ácido cafeico
Cf	Concentración final
Ci	Concentración inicial
CMI	Concentración mínima inhibitoria
DMSO	Dimetil sulfóxido
DO	Densidad óptica
EM	Extracto metanólico
FC	Fracción clorofórmica
FH	Fracción hexánica
FMR	Fracción metanólica residual
HPLC-MS	Cromatografía Líquida de Alta Resolución - Espectrometría de Masas
PC	Propóleos de Caborca
PM	Propóleos de Magdalena de Kino
PS	Propóleos de Sonoyta
PU	Propóleos de Ures
PPA	Propóleos del Pueblo de Álamos
RHOVE	Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica
UFC	Unidad Formadora de Colonias

## RESUMEN

La resistencia bacteriana es la pérdida de la sensibilidad de una bacteria a un antibiótico al que originalmente era susceptible. Hoy en día las bacterias causantes de enfermedades infecciosas, como *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus spp.*, presentan multiresistencia. Lo cual limita el número de fármacos disponible para el tratamiento de las enfermedades producidas por estos microorganismos, ocasionando índices elevados de morbimortalidad. Esto ha generado la búsqueda de nuevas sustancias alternativas, como los propóleos. Los propóleos son sustancias de origen natural que las abejas elaboran de las secreciones de metabolitos secundario, provenientes de las hojas y brotes de diversas plantas. Lo utilizan en la construcción y reparación de la colmena. A esta sustancia se le atribuye un amplio espectro de actividades biológicas entre ellas incluida la actividad antibacteriana. En el presente estudio se evaluó la actividad antibacteriana del propóleos de la región El Arenoso, Sonora. Se preparó un extracto metanólico (EM) y fracciones de este con: hexano (FH), cloroformo (FC) y metanol (FMR), los cuales se sometieron a la evaluación frente a cepas de *S. aureus* y *E. faecalis*, aisladas de procesos infecciosos mediante el método de microdilución en caldo. Los resultados obtenidos muestran que El EM y la FC presentan mayor actividad antibacteriana, inhibiendo el desarrollo de *S. aureus* 157 con una CMI<sub>90</sub> de 200mg/L y *S. aureus* ATCC6538P se vio inhibida a una CMI<sub>90</sub> de 200mg/L y 400mg/L de la FC y el EM, respectivamente. Mientras que ninguna de las fracciones ni el EM mostraron actividad antibacteriana significativa para las cepas de *E. faecalis* 132 y *E. faecalis* 531.

## 1. INTRODUCCIÓN

La resistencia bacteriana es la pérdida de la sensibilidad de una bacteria a un antibiótico al que originalmente era susceptible, adquiriendo así la capacidad de soportar los efectos de dicho fármaco, el cual está destinado a eliminar o controlar al microorganismo. Una bacteria se considera resistente a un determinado antibiótico cuando la concentración máxima de dicha sustancia, que se puede alcanzar en el lugar de la infección no es suficiente para afectarle. Es decir que la concentración del antibiótico en el punto de infección es inferior a la concentración mínima inhibitoria (CMI) necesaria para eliminar el germen, y debido a efectos secundarios tóxicos no es posible o aconsejable elevar la dosis (Davidsohn y Bernard, 1998).

La CMI es la mínima cantidad de antimicrobiano capaz de inhibir el crecimiento de un microorganismo. La resistencia bacteriana surgió desde el inicio mismo de la era antibiótica. Poco después de iniciado el uso de la penicilina (1928), a partir de los años cuarenta comenzó la producción en masa de los antibióticos y se puso de manifiesto que las bacterias eran capaces de desarrollar mecanismos de resistencia. En los años cincuenta ya se conocían cepas de *S. aureus* resistentes a la penicilina. En los años setenta se hicieron resistentes a meticilina (Daza, 1998). Otro ejemplo son los neumococos que en los años cuarenta se inhibía el crecimiento de este microorganismo a concentraciones de 0,008mg/L de penicilina, y 50 años después más de la mitad de los aislados de neumococos requieren de concentraciones de 0,1 a 1mg/L, estamos

hablando de duplicar la dosis 12,5 a 125 veces para conseguir el mismo efecto que en un principio (Gérvás, 2000).

Los factores que favorecen la aparición y diseminación de la resistencia a los antibióticos es el resultado de la evolución natural, el cual es un proceso donde los microorganismos mutan y adquieren una característica que les permite sobrevivir a las condiciones de un medio. Al reproducirse pasan este rasgo a su descendencia, la cual será una generación totalmente resistente. Otro factor es el incremento del consumo de antibióticos de alto espectro, que ha dado como resultado el aumento de la velocidad de aparición de la resistencia no solo a uno sino a más de un fármaco, dando como consecuencia cepas bacterianas multiresistentes (Mestanza y Pamo, 1992). El diagnóstico erróneo de una enfermedad también contribuye a la resistencia; cuando el personal de salud diagnostica al paciente sin antes realizar estudios de identificación y sensibilidad bacteriana. También el uso incorrecto de antibióticos por parte de los pacientes, al suspender el medicamento ante una mejora, da la oportunidad a las bacterias que no fueron eliminadas de adaptarse y generar resistencia. El uso de los antibióticos como aditivos para el engorde del ganado, conlleva al aumento de las bacterias resistentes en estos animales, los cuales son sacrificados para el consumo humano. Los productos obtenidos de estos como la carne al no ser cocinados lo suficiente abren la posibilidad de adquirir estas cepas (Holmberg, Wells y col., 1984; Bogaard y Stobberingh, 1996).

En la actualidad las bacterias causantes de enfermedades infecciosas, como *S. aureus* y *Enterococcus spp.*, presentan resistencia antibiótica. Estos



microorganismos son responsables de producir lesiones superficiales en la piel, bacteriemias, osteomielitis, neumonías, endocarditis, infecciones del sistema nervioso central y del tracto urinario (Velázquez, 2005). Son un problema de salud pública, causantes de índices elevados de morbimortalidad y responsables del aumento en los costos de atención a la salud. Las bacterias del género *Enterococcus spp.*, cuya mortalidad se estima entre el 7,5% y el 37% (Das y Gray 1998; Lautenbach, Bilker y col., 1999), presentan resistencia a diversos antibióticos clínicamente importantes, tales como  $\beta$ -lactámicos, aminoglucósidos, lincosamidas y glucopéptidos. Mientras que a *S. aureus* se le atribuye un rango de mortalidad del 5% a 70% presentando resistencia a meticilina, otros  $\beta$ -lactámicos, macrólidos, tetraciclinas, aminoglucósidos, lincosamidas y glucopéptidos (Velázquez, Viguera y col., 2009). La variación que se presenta entre los rangos de mortalidad, es atribuida a la existencia de las cepas sensibles y las resistentes.

El aumento de las bacterias multiresistentes limitan el número de fármacos disponibles para el tratamiento de las enfermedades, produciendo índices elevados de mortalidad. Otro aspecto negativo es la aparición de efectos secundarios de los antibióticos como trastornos de la piel (erupciones cutáneas), gastrointestinales (diarrea y vómito), de la sangre (trombocitopenia, neutropenia y anemia) y del sistema nervioso central (cefalea), además de destruir la flora normal bacteriana (Cunha, 2001). Estos acontecimientos han llevado a los científicos a investigar nuevas sustancias naturales alternativas, preventivas y terapéuticas a partir de fuentes botánicas, como las plantas.

Las plantas sintetizan más de 100,000 metabolitos secundarios. Un metabolito secundario es un compuesto químico que no cumple funciones esenciales en el crecimiento y desarrollo de la planta, pero se encargan de ciertas funciones ecológicas como defender a la planta de la ingesta por herbívoros y protegerla de la infección de patógenos microbianos. También participan en la atracción de los insectos polinizadores y dispersores de semillas. Entre los metabolitos secundarios se encuentran los terpenos y flavonoides. Estos son generados y secretados en la superficie de las hojas y brotes, de todas las plantas terrestres, donde las abejas de la especie *Apis mellifera* los recolectan para formar lo que se conoce como propóleos (Domingo y López, 2003).

Los propóleos son un conjunto de sustancias resinosas, gomosas y balsámicas de consistencia viscosa, de color variable que va de un amarillo claro a un marrón oscuro. Las abejas los producen a partir de la mezcla de ceras, secreciones salivales y de las secreciones de las plantas, que son recolectados de hojas de diversas plantas, como el álamo, abedul, sauce, pino, roble, abeto, entre otras (Angulo, 2005). Se utilizan en el mantenimiento de la colmena para reparar grietas, fortalecer y unir celdas, además de proporcionar un ambiente aséptico, ya que impide la proliferación de microorganismo. También se emplea en la reducción de la piqueta (entrada de la colmena) que ayuda a disminuyendo el acceso del viento, frío e impedir el pase de intrusos (Palomino, Martínez y col., 2010).

Los propóleos, se han utilizado desde tiempos remotos, en el antiguo Egipto eran los principales integrantes de cremas para el embalsamiento. En Grecia

Aristóteles e Hipócrates los prescribieron en el tratamiento de ulceraciones en la piel, abscesos y heridas. Los Incas lo utilizaban cuando se presentaba un cuadro de infecciones febriles. Durante la Edad Media, se utilizaban en ungüentos como antisépticos, cicatrizantes de heridas y en solución para la desinfección bucal (Philippe, 1990).

La constitución química de los propóleos es compleja, debido a que varía en cuanto a sus compuestos, esto debido al lugar de procedencia, la vegetación, la estación del año y el clima de la región de recolección. Se han encontrado más de 300 compuestos diferentes entre los propóleos. En general están constituidos por resinas, bálsamos, ceras, aceites esenciales, polen, sustancias orgánicas y minerales (Ferré, Frasquet y col., 2004). Esta composición tan heterogénea es la responsable de su múltiple actividad biológica. A los flavonoides, tales como la pinocembrina, galangina, pinobanskina y al éster fenílico del ácido cafeico (CAPE), se le atribuyen las propiedades antibacterianas (Peña, 2008).

Se han evaluado propóleos de diferentes regiones frente a bacterias Gram positivas como *S. aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Listeria monocytogenes*, y Gram negativas entre ellas *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* no. O1, reportándose actividad antibacteriana con una prevalencia de efectividad mayor sobre las bacterias Gram positivas (Orsi, Sforcin y col., 2005).

En México estudios sobre la actividad antibacteriana de los propóleos hacia *S. aureus* y *Enterococcus spp.*, es muy escasa, sobre todo en el ámbito hospitalario como agentes causantes de infecciones. Si bien ya han quedado demostradas las propiedades antibacterianas de estas sustancias en estudios realizados en otros países, cabe destacar que dichos estudios se han llevado a cabo frente a cepas de colección las cuales difieren de las cepas de origen clínico. En base a esto, en el presente estudio se pretende evaluar la actividad antibacteriana del extracto metanólico del Propóleos de la región El Arenoso y sus fracciones (hexano, cloroformo, metanol) sobre *S. aureus* y *E. faecalis.*, aislados de procesos infecciosos.

## 2. LITERATURA REVISADA

### 2.1. PROPÓLEOS

La palabra propóleos se deriva del griego “pro”, que significa en defensa de y “polis”, ciudad, que en conjunto hace referencia a la sustancia que recubre la colmena de las abejas que cumple con funciones defensiva. Los propóleos son productos naturales resinosos, gomosos y balsámicos, de consistencia viscosa que las abejas obreras de la especie *Apis mellifera* recolectan a partir de los exudados de las cortezas y diversos tejidos de ciertas plantas como el álamo, abedul, abeto, castaño de indias, olmo, pino, sauce, roble y algunas plantas herbáceas (Angulo, 2005).

La consistencia de esta resina es muy variable, depende de su origen y de la temperatura. Hasta los 15°C es duro y se torna más maleable a medida que aumenta la temperatura. Su punto de fusión oscila entre 60 a 70°C, llegando en algunos casos hasta 100°C. Su color también es variable, de amarillo claro a marrón oscuro, pasando por una gran cantidad de tonos castaño. Es soluble en alcohol y en solventes tales como éter, acetona, benceno, tricloroetileno y otros (Neacato, 2005).

Las abejas lo utilizan como un arma química en la protección de la colmena contra microorganismo ya que impide su proliferación, a pesar de que las condiciones, como la temperatura (35°C), dentro de la colmena son las adecuadas para la reproducción de los microorganismos. Otro de sus usos consiste en el mantenimiento de la colmena, empleándolo en la reparación de

grietas o hendiduras de las paredes internas. También se usa en la reducción de la vía de acceso de la piquera, disminuyendo así la entrada de viento, el frío y protege contra la invasión de intrusos. Asimismo se aplica en el aislamiento de partículas o cuerpos extraños dentro de la colmena para evitar su descomposición y mantener así un ambiente aséptico (Palomino, Martínez y col., 2010).

### **2.1.1. Recolección de los propóleos trabajados por las abejas**

Las abejas recolectoras (pecoreadoras) extraen los propóleos de las hojas o brotes de las plantas, valiéndose de sus mandíbulas y con ayuda de su primer par de patas. Las secreciones de las glándulas mandibulares de las abejas como el ácido 10-hidroxi-2-decenoico y el ácido 9-oxo-2-decenoico permiten el ablandamiento y la trituración de los propóleos. Luego utilizando una de las patas del segundo par, transfieren los propóleos a la corbícula (cestillas) de la pata posterior del mismo lado y viceversa. Esta operación puede durar de 15 minutos a 1 hora aproximadamente y la pueden realizar sobre la superficie del brote o en pleno vuelo. La extracción se realiza durante las horas más calientes del día, por lo regular de 10:00 a las 15:30 horas, ya que a temperaturas altas el propóleos se vuelve más maleable, facilitando así la recolección (Yoong, 2004).

Cuando las abejas recolectoras llegan a la colmena con la carga, se dirige al lugar donde éste se necesita y permanecen quietas. Mientras otras obreras (propolizadoras) se les acercan para descargar los propóleos, toman algunas partículas de la sustancia, las colocan en el lugar deseado, las comprimen, les

agregan cera y secreciones salivales. A menudo las abejas recolectoras no entran en la colmena y se procede a la descarga en la piquera, una vez que quedan libres de sus cargas regresan inmediatamente en busca de más propóleos (Sofiysky, 2002). En la figura 1 se muestra a las abejas *Apis mellífera* colectando y elaborando el propóleos.

### **2.1.2. Antecedentes históricos**

Desde tiempos remotos, algunos milenios antes de Cristo, los propóleos ya eran conocidos y empleados por diferentes culturas con diversas finalidades terapéuticas. En el primer libro de medicina, titulado “Libro de preparación de medicamentos para todas las partes del cuerpo humano”, en el papiro de Ebers (1700 a.C.), ya se mencionaba a los propóleos como medicamentos, refiriéndose a ellos como ceras negras (Philippe, 1990). En el antiguo Egipto los sacerdotes observaron en estas resinas la capacidad de evitar la descomposición, empleándolos para el embalsamiento de los faraones. En Grecia Hipócrates y Aristóteles prescribieron los propóleos para el tratamiento de úlceras en la piel y abscesos. En Roma se emplearon como antisépticos, cicatrizantes y en soluciones para desinfección bucal. En el continente Americano los incas los utilizaban cuando se presentaba un cuadro de infecciones febriles. Durante los siglos XIV y XVIII en el continente europeo los franceses los emplearon en el tratamiento de llagas. En el siglo XVII Stradivari los utilizaba para barnizar sus instrumentos musicales, hay quien dice que las propiedades de los propóleos tienen algo que ver con la prodigiosa sonoridad de sus instrumentos. Su máximo empleo se dio durante el siglo XX con los conflictos bélicos, en las guerras de Boers, se utilizó como sustancia



**Figura 1.** Abejas *Apis mellifera* colectando y elaborando el propóleos (Palomino, 2009).



cicatrizante en el tratamiento de heridas infectadas y así evitar la aparición de gangrena (González y Bernal, 1997).

### **2.1.3. Procedencia de su composición y origen botánico**

La composición química de los propóleos es muy compleja, varía de acuerdo a la vegetación, la estación del año y el clima de la región de recolección. Además, se ha determinado que los componentes de los propóleos se originan de tres fuentes: los exudados de las plantas que colectan las abejas, las sustancias secretadas por el metabolismo de las abejas y los materiales que se introducen durante la elaboración de los propóleos (Palomino, 2009).

A la fecha se han identificado más de 300 constituyentes diferentes entre los propóleos. En general la composición química promedio de los propóleos está constituida por resinas y bálsamos que contienen flavonoides y ácidos fenólicos o sus esteres (50%), contenidos muy variables de ceras (7,5-35%) que afectaran a los correspondientes restantes componentes, aceites esenciales (10%), polen (5%) e impurezas (4,4-19,5%). También presentan pequeñas cantidades de vitamina A y B, minerales como aluminio, plata, hierro, zinc y potasio entre otros (Peña, 2008). Además contienen pequeñas cantidades de terpenos, taninos, restos de secreción de las glándulas salivales de las abejas y posibles contaminantes (Ferré, Frasquet y col., 2004). La cera, el polen y detritos orgánicos son removidos cuando se preparan extractos alcohólicos (Burdock, 1998). En la tabla 1 se presenta la composición química promedio de los propóleos.

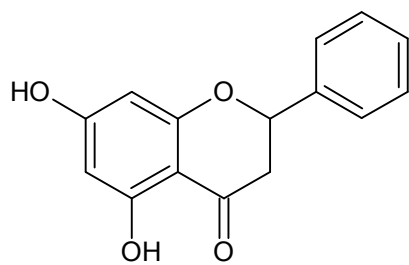
**Tabla 1.** Composición promedio de los propóleos.

<b>Composición</b>	<b>(%)</b>	<b>Compuestos, características y observaciones</b>
Resinas y bálsamos	45-55	Flavonoides, ácidos fenólicos y ésteres.
Ceras	7,55-35	Mayoría cera de abeja, también de origen vegetal.
Aceites aromáticos y esenciales	5-10	Terpenoides volátiles.
Polen	5	Proteínas del polen y aminoácidos libres, predominan arginina y prolina.
Sustancias orgánicas y minerales	5	14 oligoelementos Fe y Zn son los más abundantes, otros: Al, Au, Ag, Cs, Hg, K, Sb Cetonas. Lactonas. Quinonas. Esteroides. Ácido benzoico y ésteres. Vitaminas: B1, B2, B3, B6. Pequeñas cantidades procedentes principalmente del polen. Azúcares.

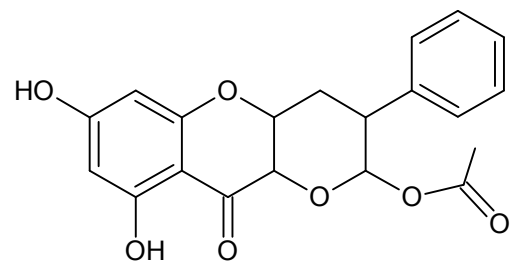
(Krell, 1996).

#### 2.1.4. Propóleos de zonas templadas

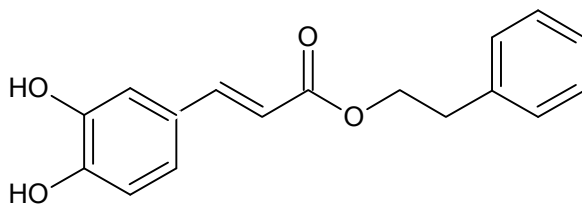
Se ha demostrado en los propóleos de zonas templadas como Europa, Norte América y Noroeste de Asia, que la principal fuente botánica de exudados de los brotes proviene de especies de álamos (*Populus spp.*) junto con sus híbridos, y abedules (*Betula spp.*). Investigaciones realizadas sobre los propóleos recolectados de Bulgaria, España, Francia, Gran Bretaña, Hungría, Rusia, Ucrania, Mongolia revelan que el origen de la fuente principal de las secreciones son de el álamo negro (*Populus nigra*), álamo temblón (*P. tremula*) abedul verrugoso (*Betula verrucosa*) (Bankova, Castro y col., 2000; Marcucci, Ferreres y col., 2001). Los principales constituyentes químicos de los propóleos de zonas templadas son los compuestos fenólicos, flavonoides, ácidos aromáticos y sus ésteres. En propóleos de procedencia china se identificaron compuestos tales como ácido caféico, ácido p-coumarico, ácido ferúlico, pinobanksina, ácido cinamilideneacético, crisina, pinocembrina, galangina, cinamil cafeato y tectocrisina, entre otros. Al noroestes de los Países Bajos se aislaron de los propóleos cuatro flavonoides (crisina, galangina 7-metil éter, pinobanksina y pinobanksina 5-metil éter), seis compuestos derivados del ácido cinámico (ácido ferúlico, ácido isoferúlico, ácido 3,4-dimetoxi cinámico, cafeato de bencilo, cafeato de fenetilo y cafeato de cinamilo) y dos nuevos derivados del glicerol (2-acetil-1,3-dicoumaroilglicerol y 2-acetil-1-coumaroil-3-feruloil glicerol) (Banskota, Nagaoka y col., 2002). En la figura 2 se muestran la estructura química de algunos compuestos de los propóleos de zonas templadas.



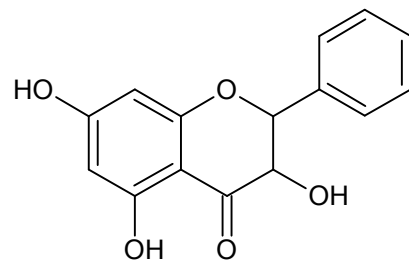
Pinocembrina



3-O-acetato de pinobanksina



CAPE



Pinobanksina

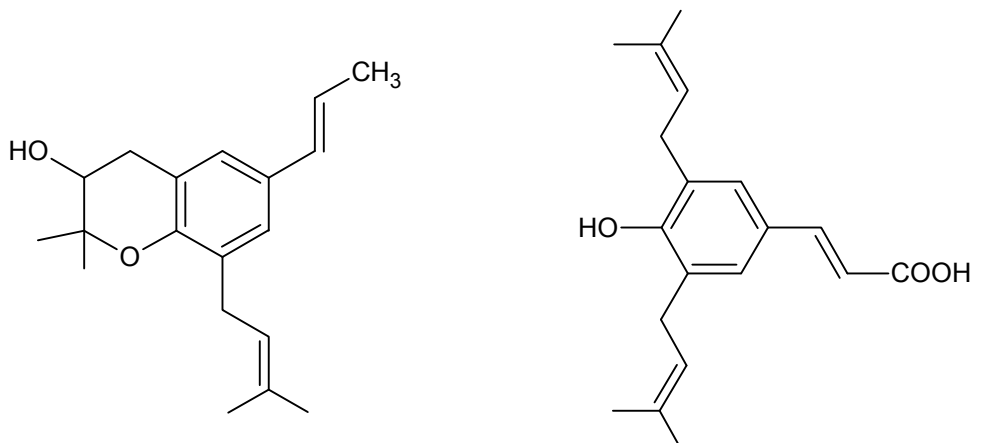
**Figura 2.** Estructura química de los compuestos aislados de propóleos de zonas templadas.

### **2.1.5. Propóleos de zonas tropicales**

La fuente botánica de los exudados de los países con clima tropical como África, América del Sur, México y Cuba, difieren de los anteriores. Dado que no se encuentran álamos ni abedules en estas regiones. En Venezuela la fuente botánica de los propóleos proviene de quiripiti (*Clusia minor*) y del mamey silvestre (*Clusia major*). En Brasil la flora dominante es el pino de Norfolk (*Araucaria heterophylla*), pino de Paraná (*Araucaria angustifolia*), chilca blanca (*Baccharis dracunculifolia*) y eucalipto aromático (*Eucalyptus citriodora*) (Bankova, 2005). A diferencia de los propóleos de zonas templada los principales componentes de los propóleos de zona tropical son, el ácidos p-coumáricos, prenilados, acetofenonas, lignanos, di y triterpenos. En Chile en la región de Toro Bayo se aislaron de los propóleos los flavonoides galangina, crisina, pinocembrina, 3-metil galangina y 7-metil galangina. En propóleos de Venezuela se confirmó la presencia de dos nuevas benzofenonas polipreniladas (18-etiloxi-17-hidroxi-17,18-dihidroscrobiculatona A y B). En Brasil se han aislado compuestos prenilados, diterpenos y benzofuranos, entre ellos ácido 3-hidroxi-2,2-dimetil-8-prenilcromano-6-propenoico, ácido agático, benzofuranos A y B, ácido 3-prenil-4-hidroxicinámico, entre otros (Trusheva, Popova y col., 2004). En la figura 3 se observa la estructura química de algunos compuestos de los propóleos de zonas tropicales.

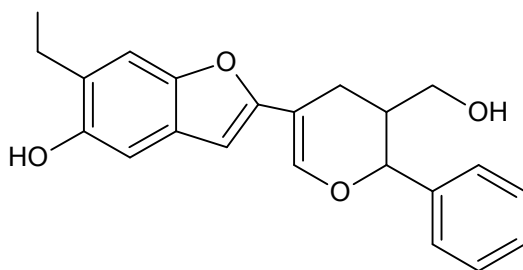
### **2.1.6. Propóleos de Sonora**

Los propóleos de Sonora son clasificados como propóleos de zonas áridas y semiáridas, por tener un clima con temperaturas altas, veranos secos, inviernos fríos y con lluvia. Tienen su fuente en una gran variedad de flora



Ác 3-hidroxi-2,2dimetil-8-prenil  
cromano-6-propenoico

Ác. 4-hidroxi-3,5-diprenil cinámico



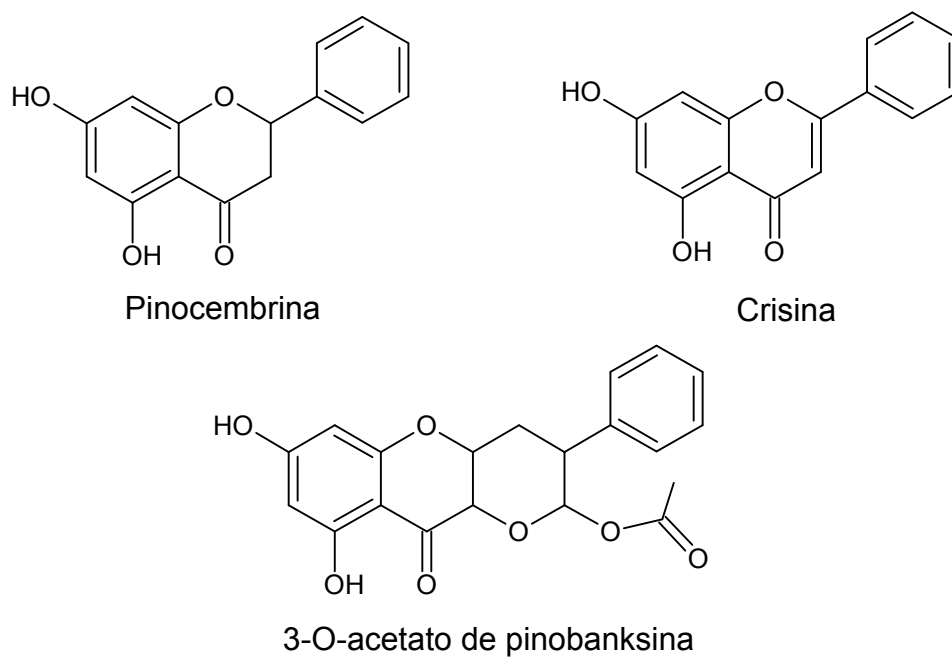
Benzofurano A

**Figura 3.** Estructura química de los compuestos aislados de propóleos de zonas tropicales.

como palo fierro (*Olneya tesota*), mezquite aterciopelado (*Prosopis velutina*), palo verde (*Cercidium microphyllum*), torote prieto (*Bursera laxiflora*), granjeno (*Celtis pallida*), franseria (*Ambrosia deltoidea*), hierva blanca (*Encelia Farinosa*) entre otras. En una investigación realizada sobre propóleos de Ures (PU), se aislaron e identificaron los flavonoides, pinocembrina, 3-O-acetato de pinobanksina y crisina (Figura 4) (Lugo, 2003). Estudios posteriores, sobre los compuestos de propóleos de las regiones de Ures, Pueblo de Álamos y Caborca, pusieron de manifiesto la presencia de 11 flavonoides y el éster fenílico del ácido caféico (CAPE) los cuales fueron identificados a través de Cromatografía Líquida de Alta Resolución-Espectrometría de Masas (HPLC-MS). Pinocembrina, pinobanksina, acetato de pinobanksina, galangina y crisina se encontraron en las tres muestras de propóleos. Mientras que xanthomicrol se identificó en los propóleos del Pueblo de Álamos (PPA) y Caborca (PC); acacetina en PU y PPA; rutina, naringenina y hesperetina se detectaron solo en PPA; 3'-demetoxysudachitin se encontró solo en PC; en tanto que CAPE se identificó solo en PU (Tabla 2) (Acosta, 2007).

### **2.1.7. Acción biológica de los propóleos**

Desde tiempos ancestrales los propóleos se han utilizado con fines medicinales, para combatir distintas enfermedades, y esto debido a que los propóleos poseen un amplio espectro de actividades biológicas. En la actualidad estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que los propóleos poseen propiedades antibacterianas (Bankova, Christov y col., 1999; Popova, Silici y col., 2005), antifúngicas (Quiroga, Sampietro y col., 2006), antivirales (Amoros, Lurton y col., 1994), antiinflamatorias (Khayyal, Elghazaly y col., 1993),



**Figura 4.** Estructura química de los compuestos aislados de propóleos de Ures, Sonora.



**Tabla 2.** Principales compuestos presentes e identificados por HPLC-MS en propóleos sonorenses.

<b>Compuesto</b>	<b>PU</b>	<b>PC</b>	<b>PPA</b>
Rutina	-	-	+
Pinobanksina	+	+	+
Naringenina	-	-	+
Hesperetina	-	-	+
3'-Demetoxisudaquitín	-	+	-
Pinocembrina	+	+	+
3-Acetato de pinobanksina	+	+	+
Éster fenilico del ácido cafeico (CAPE)	+	-	-
Xanthomicrol	-	+	+
Crisina	+	+	+
Galangina	+	+	+
Acacetina	+	-	+

PC Propóleos de Caborca; PU, Propóleos de Ures; PPA, Propóleos de Pueblo de Álamos; +, presente pero no cuantificado; -, no detectado (Acosta 2007).

antioxidantes (Choi, Noh y col., 2006), antiproliferativas (Akao, Maruyama y col., 2003), antiparasitarias (Nilforoushzadeh, Shirani y col., 2008) entre otras.

#### **2.1.8. Propiedades antimicrobianas**

Las propiedades antibacterianas de los propóleos se le atribuyen fundamentalmente a los flavonoides, tales como pinocembrina, galangina, pinobanksina, éster bencil del ácido p-cumárico y mezclas de ésteres del ácido cafeíco. Varios investigadores han sugerido que el mecanismo de actividad antibacteriana de los propóleos es multifactorial y depende del sinergismo entre flavonoides, ácidos fenólicos y otros compuestos presentes en ellos, y no a la acción que cada uno de ellos ejerce por separado (Li, Yue, y col., 2003). El mecanismo de acción antibacteriana de los propóleos es complejo y no está completamente establecido, pero en algunos estudios realizados, se sugieren como probables causas la desorganización del citoplasma, de la membrana plasmática, y de la pared celular, bacteriólisis parcial, inhibición de la ARN polimerasa, inactivación del potencial de membrana e inhibición de la síntesis de proteínas (Takaisikikuni y Schilcher, 1994; Pepeljnjak y Kosalec, 2004). Se ha reportado que el flavonoide galangina induce una fuerte pérdida de potasio en *S. aureus*, lo que sugiere un daño en la membrana plasmática (Cushnie y Lamb, 2005). En *Proteus vulgaris* los flavonoides robinetina, miricetina y epigallocatequina, inhiben la síntesis de ADN, mientras que en *S. aureus* estos mismos flavonoides interrumpen la síntesis de ARN (Mori, Nishino y col., 1987).

### 2.1.9. Estudios realizados sobre propóleos

La actividad antimicrobiana de los propóleos estudiada frente a bacterias de interés clínico, ha mostrado resultados alentadores inhibiendo el crecimiento de bacterias aerobias y anaerobias, tanto Gram positivas como Gram negativas. Sin embargo, se ha señalado que el efecto biocida en contra de bacterias Gram positivas es mayor que sobre bacterias Gram negativas (Orsi, Sforcin y col., 2005). Propóleos italianos presentan actividad antimicrobiana frente a *Streptococcus pyogenes* y los de Bulgaria inhiben el desarrollo de *Helicobacter pylori* (Boyanova, Derejian y col., 2003). Investigaciones sobre los propóleos brasileños revelaron que inhiben el crecimiento de cepas de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *Porphyromonas gingivalis* y de *Prevotella intermedia* (Bankova, Christov y col., 1999; Sforcin, Fernandes y col., 2000). Los propóleos turcos son activos frente a *Micrococcus luteus*, *E. faecalis*, *Enterobacter aerogenes* y *P. aeruginosa* (Uzel, Sorkun y col., 2005). Estudios realizados en propóleos de las regiones de Caibarién y Ciego de Avila, en Cuba demuestran actividad antibacteriana contra cepas de *S. aureus* y *Staphylococcus epidermidis* (García, Medina y col., 2007). Los propóleos argentinos (Buenos Aires y Mendoza) y colombianos poseen propiedades antibacterianas sobre *Streptococcus mutans* (Moreno, Martínez y col., 2007) al igual que los de Oxapampa, Perú; además estos últimos presentan acción frente a *Lactobacillus casei* (Eguizábal y Moromi, 2007). Manrique (2006) evaluó el efecto de la variación estacional sobre la actividad antibacteriana de propóleos venezolanos, frente a *S. aureus* y *M. luteus*; los propóleos se mostraron activos frente a dichas cepas, pero el grado de inhibición vario según el mes de recolección, mostrándose una inhibición

mayor en el mes de enero. En propóleos mexicanos de la región de Campeche se ha informado actividad frente a *S. aureus*, *S. pyogenes* y *P. aeruginosa* (Tolosa y Cañizares, 2002).

#### **2.1.9.1. Propóleos Sonorenses**

Velázquez, Navarro y col., (2007) realizaron estudios sobre la actividad antibacteriana de los propóleos del estado de Sonora de las regiones de Ures (PU), Caborca (PC) y Pueblo de Álamos (PPA). Se demostró que los PU tienen una mayor actividad antibacteriana sobre *S. aureus* ATCC6538P y *Listeria monocytogenes* ATCC7644, con una CMI de 100mg/L y 200mg/L respectivamente; mientras que los PC poseen actividad solo frente a *S. aureus* ATCC6538P moderada con una CMI de 200mg/L; los PPA no mostraron actividad alguna frente a ninguna de las cepas; por último ninguno de los extractos mostró acción antibacteriana contra las bacterias Gram negativas (*E. coli* ATCC25922 y *P. aeruginosa* ATCC27853). Estudios posteriores de los PU mostraron que a concentraciones de 200mg/L hay actividad bactericida (Iñigo y Soto, 2009). Investigaciones más recientes han demostrado que los propóleos de la región de Magdalena de Kino (PM) y Sonoyta (PS) poseen actividad antibacteriana frente a *S. aureus* ATCC6538P y *V. cholerae* no O1. Reportándose que el extracto metanólico de PM muestra una mayor actividad antibacteriana, con concentraciones inhibitorias de 200mg/L para *S. aureus* ATCC6538P y 400mg/L para *V. cholerae* no O1, y el extracto metanólico de PS presenta concentraciones de 400mg/L para ambas especies de cepas (Salcido, 2010).

## **2.2. ANTIBIÓTICOTERAPIA**

El descubrimiento que dio inicio a la edad de oro de la antibíoticoterapia fue el descubrimiento de la penicilina por Alexander Fleming, en 1928, a partir del cultivo del hongo *Penicillium notatum*. El cual dio origen en las décadas siguientes al desarrollo exponencial de una gran diversidad de antibíoticos nuevos. El término antibíoticos se refiere a sustancias químicas elaboradas por organismos vivos que tienen la capacidad de matar o inhibir el crecimiento de ciertas clases de microorganismos (Davidsohn y Bernard, 1998).

### **2.2.1. Resistencia a los antibíoticos**

La resistencia a los antibíoticos se define como, una condición microbiológica caracterizada por la capacidad natural o adquirida, por parte de una cepa bacteriana de permanecer intacta a los efectos bactericidas o bacteriostáticos de un antibíotico. La resistencia natural es una propiedad específica en la cual las bacterias de la misma especie son resistentes a algunas familias de antibíoticos, como consecuencia de que estos microorganismos carecen de dianas (estructura o grupo química) sobre las cuales actuaría el antibíotico. La resistencia adquirida es la realmente importante desde un punto de vista clínico, esta se debe a la modificación de la carga genética de la bacteria y puede aparecer por mutación cromosómica o por mecanismos de transferencia genética (Cabrera, Gómez y col., 2007).

Un microorganismo se considera resistente a un antibíotico cuando la concentración máxima de antimicrobiano que se puede conseguir en el lugar de la infección (líquidos, tejidos o suero) no es suficiente para eliminarlo, y que

por efectos secundarios tóxicos es imposible elevar la dosis (Davidsohn y Bernard, 1998).

### **2.3. *Staphylococcus aureus***

*S. aureus* forma parte de la familia *Micrococcaceae*, se encuentra habitando naturalmente la piel y las membranas mucosas del hombre. Es un coco Gram positivo, no móvil, se le puede encontrar agrupado en formas de racimos, anaerobio facultativo, pero crece mejor en condiciones aerobias. Tiene una temperatura óptima de crecimiento de 35 a 37°C, es productor de catalasa, coagulasa y crece rápidamente en agar sangre. Sus colonias producen un típico pigmento amarillo debido a la presencia de carotenoides.

Es un patógeno reconocidamente virulento que causa infecciones hospitalarias y comunitarias (Kanafani y Fowler, 2006). Es responsable de una amplia gama de enfermedades. Produce lesiones superficiales en la piel y abscesos localizados en otros sitios. Causa infecciones del sistema nervioso central e infecciones profundas como osteomielitis y endocarditis. Es causante de infecciones respiratorias como neumonía, infecciones del tracto urinario y además, causa bacteriemia, impétigo y fiebres (Velázquez, 2005). *S. aureus* representa el 30 a 50% de los aislados clínicos. De este porcentaje el 70% corresponde a cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM).

Por lo general la mayoría de las cepas de SARM presentan resistencia a otros  $\beta$ -lactámicos (cefalosporinas, oxacilina y nafcilina) a macrólidos (eritromicina), tetraciclina, aminoglucósidos (estreptomicina), lincosamidas

(clindamicina), y con susceptibilidad disminuida a vancomicina, entre otros (Velázquez, Viguera y col., 2009).

En México, la Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica (RHOVE) notificó que los porcentajes de mortalidad entre pacientes infectados con *S. aureus* varían entre 5 y 70%. También reportó que en el periodo de 1997-2003, *S. aureus* ocupó el tercer lugar en morbilidad y el cuarto lugar en mortalidad. En estudios realizados por Lalueza (2008), en pacientes con bacteriemia causada por *S. aureus* se reportó un mortalidad del 20,2%. Mientras que Fowler, Olsen y col., (2003) reportan una mortalidad del 28%.

#### **2.4. *Enterococcus spp***

El género *Enterococcus spp.*, forma parte de la familia *Enterococcaceae*, se encuentran habitando el tracto gastrointestinal del hombre. Pueden encontrarse también en el tracto genitourinario y en la saliva (Díaz, Salas y col., 2007). Inicialmente se clasificaron como cocos Gram positivos del género *Streptococcus* hasta que en la década de los ochenta fueron excluidos de esta clasificación y con base en estudios genéticos se creó el género *Enterococcus* (Schleifer y Kilpper, 1984). Son cocos que se presentan agrupados en parejas o cadenas cortas, son anaerobios facultativos, con crecimiento óptimo a 35°C pero lo pueden hacer en un rango de temperatura de 10 a 46°C, la mayoría son inmóviles (a excepción de *E. casseliflavus* y *E. gallinarum*), hidrolizan la esculina en presencia de 40% de sales biliares, catalasa y oxidasa negativos. En las últimas décadas los enterococos han pasado de ser considerados

comensales de baja patogenicidad a convertirse en una importante causa de infecciones humanas (Díaz, Rodríguez, y col., 2010).

Las diferentes especies de enterococos han sido identificadas como patógenos oportunistas causantes de diferentes enfermedades dentro de las que se encuentran las endocarditis, bacteriemias enterococcicas, infecciones del tracto urinario, neonatales, del sistema nervioso central, intrabdominal y pélvica (Murray, 1990). Destacan principalmente a nivel hospitalario como agentes causales de infecciones en humanos, *E. faecalis*, con el 80 a 90% de los aislados clínicos y *E. faecium* del 10 a 24% (Díaz, Salas y col., 2007). Presentan resistencia a diversos antibióticos clínicamente importantes, tales como  $\beta$ -lactámicos (penicilinas y cefalosporinas), aminoglucósidos (gentamicina y estreptomina), lincosamidas (clindamicina) y glucopéptidos (vancomicina) (Velázquez, Viguera y col., 2009). Los enterococos presentan una mortalidad atribuible entre el 7,5% y el 37%, esta variación se debe a la existencia de las cepas sensibles y resistentes a los antibióticos (Das y Gray 1998; Lautenbach, Bilker y col., 1999). Stosor, Peterson y col., (1998) reportan una mortalidad global del 41%, del cual el 9% se atribuye directamente a las bacteriemia causadas por *E. faecium*. Datos similares se reportan en los estudios realizados por Fernández, Fuente y col., (2004) con respecto a *E. faecalis* donde se observó una mortalidad global de 23,9%, pero solo el 9,9% fue atribuible a dicho microorganismo. Entre tanto Martínez, Muñoz y col., (2007) reportan un mortalidad de 31,2% para *E. faecalis* y 33,3% para *E. faecium*.



Una de las causas que contribuyen a la patogénesis de estos microorganismos es su resistencia a los antibióticos, lo que dificulta la terapia de las enfermedades causadas por ellos. Hasta el momento las alternativas de tratamiento para las bacterias multiresistentes, son la administración de vancomicina, linezolid y daptomicina. A nivel mundial son cada vez más los reportes de aislamientos de *Enterococcus spp.*, vancomicina resistentes y *S. aureus* con valores intermedios o susceptibilidad disminuida a vancomicina. Lo anterior limita drásticamente los antibióticos disponibles para el tratamiento de enfermedades relacionadas a dichos microorganismos (Velázquez, Viguera y col., 2009).

### 3. OBJETIVOS

#### Objetivo general

Evaluar la actividad antibacteriana del extracto metanólico (EM) de propóleos de Caborca y sus fracciones frente a cepas de aislados clínicos de *S. aureus* y *E. faecalis*.

#### Objetivos específicos

- Obtención del EM y sus fracciones.
- Evaluar la actividad antibacteriana del EM y sus fracciones a diferentes concentraciones frente a las cepas de aislados clínicos de *S. aureus* y *E. faecalis*.
- Establecer la concentración mínima inhibitoria (CMI) del EM y sus fracciones.

## **4. PARTE EXPERIMENTAL**

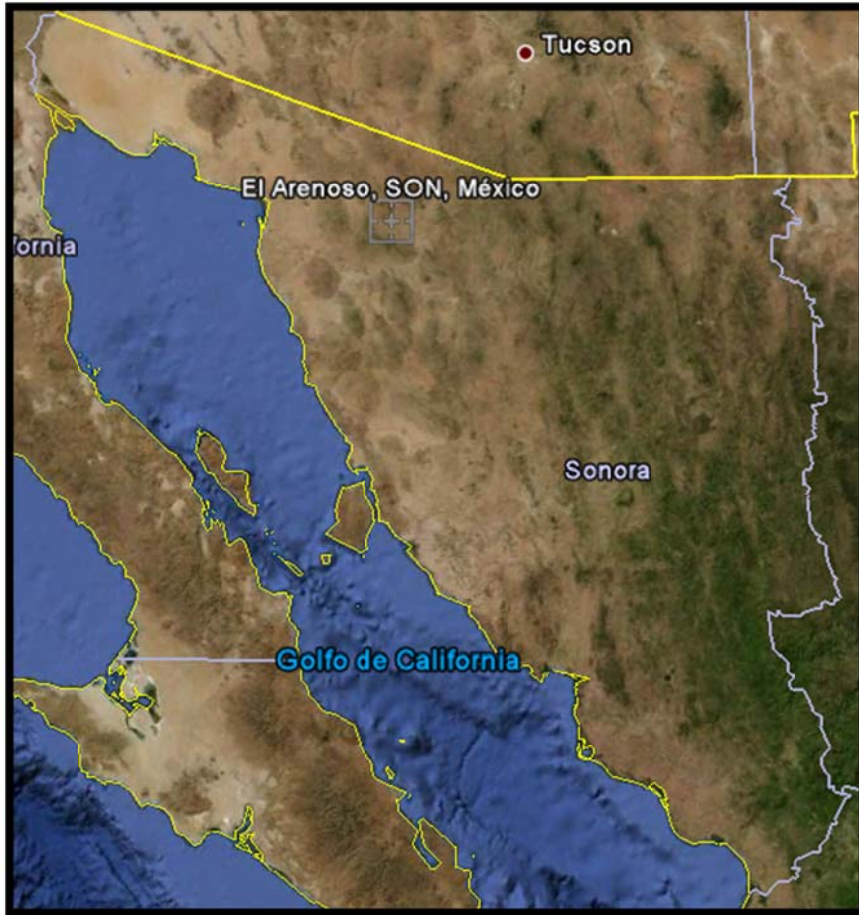
### **4.1. MUESTRA DE PROPÓLEOS**

El propóleo se colectó durante el mes de agosto de 2011 a partir de cajas apícolas de la región El Arenoso, Sonora (30° 43' 35.64" N; 112° 06' 42.07" W, y una altitud de 298 m sobre el nivel del mar) (Figura 5). La muestra fue obtenida por el método de raspado, utilizando una espátula de acero inoxidable para remover la resina adherida en las paredes de las cajas apícolas (Ordóñez, Vera y col., 2007). Una vez obtenida la muestra, se colocó en un envase de polietileno y se almacenó a 8°C protegiéndose de la luz, hasta su uso. El peso de la muestra fue de 98,23g.

### **4.2. EXTRACTO METANÓLICO (EM)**

Noventa y ocho gramos punto veintitrés miligramos de propóleos, previamente molidos, se colocaron en un matraz Erlenmeyer y se le adicionó 500mL de metanol, la mezcla se colocó sobre un agitador magnético (S-7225 THERMOLYNE) durante 24h. Transcurrido el tiempo, se filtró sobre tela de algodón, con la finalidad de eliminar restos sólidos y sobre papel filtro (Whatman #40), tres veces, para eliminar partículas de tierra y polen. El filtrado se colocó en un embudo de separación, se le añadió 180mL de hexano, y se agitó por 15min a mano. Se obtuvieron dos fracciones: filtrado metanólico y el filtrado hexánico.

El filtrado metanólico se concentró en un rotavapor (R-215 BUCHI) bajo presión reducida a una temperatura de 40°C a 100rpm. Posteriormente se secó al alto



**Figura 5.** Ubicación geográfica de la región El Arenoso.

vacío ( $1 \times 10^{-4}$  mHg), y se obtuvo 53,39g de extracto metanólico (EM), sólido de color café oscuro.

#### **4.2.1. Partición del EM**

El filtrado hexánico se dejó en la campana de extracción, una vez evaporado el hexano se obtuvo 1,54g de un sólido amarillo, el cual se etiquetó como fracción hexánica (FH). Para la fracción clorofórmica (FC), 52,89g del EM se trató con 150mL de éter etílico y se dejó en agitación por 3h, la muestra se disolvió por completo por lo que se procedió a evaporar el éter etílico. Una vez evaporada la sustancia se añadió 150mL de cloroformo y se agitó por 3h. La parte soluble se filtró sobre papel, tres veces y se concentró en un rotavapor bajo las mismas condiciones descritas anteriormente, obteniendo 46,42g de la FC, sólido de color café. La parte insoluble en cloroformo se trató con 20mL de éter etílico nuevamente, pero no se observó dilución alguna, por lo que se procedió una vez más a evaporar dicha sustancia. Posteriormente se agregó 20mL de metanol y se puso en agitación durante 3h, bajo la misma metodología descrita anteriormente, obteniendo 1,10g de la fracción metanólica residual (FMR), sólido de café oscuro. Cada fracción se almacenó en viales a una temperatura de 8°C y se mantuvieron protegidos de la luz.

#### **4.3. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA**

La evaluación antibacteriana se realizó en colaboración con el Laboratorio del Cuerpo Académico de Biología y Bioquímica (CABB), de la Universidad de Sonora, Unidad Centro, utilizando el método de microdilución en caldo asesorado por el M.C. Moisés Navarro Navarro.

#### **4.3.1. Soluciones concentradas y de trabajo**

Una alícuota de aproximadamente de 45mg del EM, se llevó a un volumen final de 1mL con dimetil sulfóxido (DMSO) estéril, en un tubo eppendorf de 1,5mL estéril, para obtener una concentración final de 45 000mg/L. A partir de esta solución concentrada, se realizaron diluciones en caldo Mueller Hinton (BBL™) (CMH) sobre una placa de 12 pozos, para obtener las soluciones de trabajo de 400, 200, 100, 50 y 0mg/L. El procedimiento fue el mismo para cada una de las fracciones. Ver apéndice 9.1 a 9.7.

#### **4.3.2. Cepas bacterianas**

Se utilizaron las cepas de *S. aureus* ATCC6538P tomada del cepario del Departamento de Ciencias Químico y Biológicas (para el ensayo de práctica), *S. aureus* 157, *E. faecalis* 132 y *E. faecalis* 531 aisladas a partir de muestras clínicas de pacientes del ISSSTESON en Hermosillo, Sonora (Tabla 3). Se mantuvieron en Agar Soya Trypticaseína (BBL™) (AST) realizando pases sucesivos, hasta su uso.

#### **4.3.3. Inoculo bacteriano**

Se prepararon inóculos bacterianos en solución salina estéril previo a un desarrollo de 12h en Agar Mueller Hinton (BBL™) (AMH) a 36°C, hasta lograr una densidad óptica (DO) de  $0,093 \pm 0,002$ , igual a la DO del estándar 0,5 del nefelómetro de Mcfarland a 630nm. El inóculo equivale a  $10^8$ UFC/mL. Las lecturas se realizaron en un lector de microplacas (DAIGGER®).

**Tabla 3.** Características de las cepas clínicas.

<b>Cepas</b>	<b>Origen</b>	<b>Resistencia</b>
<i>S. aureus</i> 157	Cultivo vaginal	Be <sup>‡</sup> , Am <sup>*</sup> , E <sup>‡</sup> , Cl <sup>†</sup>
<i>E. faecalis</i> 132	Cultivo vaginal	E <sup>‡</sup> , Cl <sup>†</sup> , Qu/D <sup>‡‡</sup>
<i>E. faecalis</i> 531	Urocultivo	Be <sup>‡</sup> , Am <sup>*</sup> , Cl <sup>†</sup> , Qu/D <sup>‡‡</sup> , Te <sup>**</sup>

‡ Bencilpenicilina, \*Ampicilina, ‡ Eritromicina, † Clindamicina, ‡ ‡  
 Quinupristina/Dalfopristina, \*\*Tetraciclina

#### **4.3.4. Evaluación de la actividad antibacteriana**

La evaluación de la actividad antibacteriana se determinó mediante el método de microdilución en caldo. Se depositaron por triplicado 200µL de cada una de las concentraciones (400, 200, 100 y 50mg/L) del EM y sus fracciones (EM, FH, FC y FMR) en una microplaca de 96 pozos de fondo plano. A un primer conjunto de pozos se le adiciono 15µL del inóculo bacteriano y se preparará otro conjunto sin bacterias. En otros tres pozos se depositaron 200µL de CMH con gentamicina a una concentración de 12mg/L, más 15µL de inóculo bacteriano, en tres más se depositaron 200µL de CMH con la máxima concentración de DMSO al que las bacterias estuvieron expuestas más 15µL del inóculo bacteriano. Para el control de esterilidad se añadió en seis pozos CMH. Una vez finalizada la inoculación, la placa se incubó (incubadora THERMO scientific) a 36°C y se leyó la DO a 630nm de los pozos a las 0, 6, 12, 24 y 48h. Con las lecturas se realizarán curvas de desarrollo bacteriano, graficando tiempo contra DO. Ver apéndice 9.8 y 9.9.

#### **4.3.5. Determinación de la CMI**

La CMI es la mínima cantidad de antimicrobiano capaz de inhibir el crecimiento de un microorganismo al menos el 90% del desarrollo bacteriano después de 24h a 36°C, para determinar la CMI se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{CMI} = \left( \frac{x\text{DO}_{630}\text{bacterias sin tratamiento} - x\text{DO}_{630}\text{concentración de prueba}}{x\text{DO}_{630}\text{bacterias sin tratamiento}} \right) \times 100$$



#### **4.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Para el procesamiento de los datos se utilizó estadística descriptiva. Las medias y desviaciones estándar de las lecturas de DO en las curvas de desarrollo se graficaron utilizando el paquete Graph Pad Prism V 5.00

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIONES

En el presente estudio se evaluó la actividad antibacteriana de un EM y tres fracciones (FH, FC y FMR) del propóleo de la región El Arenoso, Sonora, el cual proviene de una región árida, frente a cepas de aislados clínicos de *S. aureus*, *E. faecalis*, las cuales presentan resistencia a más de un antibiótico. En cada uno de los ensayos realizados, el desarrollo bacteriano no se vio afectado por la concentración de DMSO presente en el medio de cultivo.

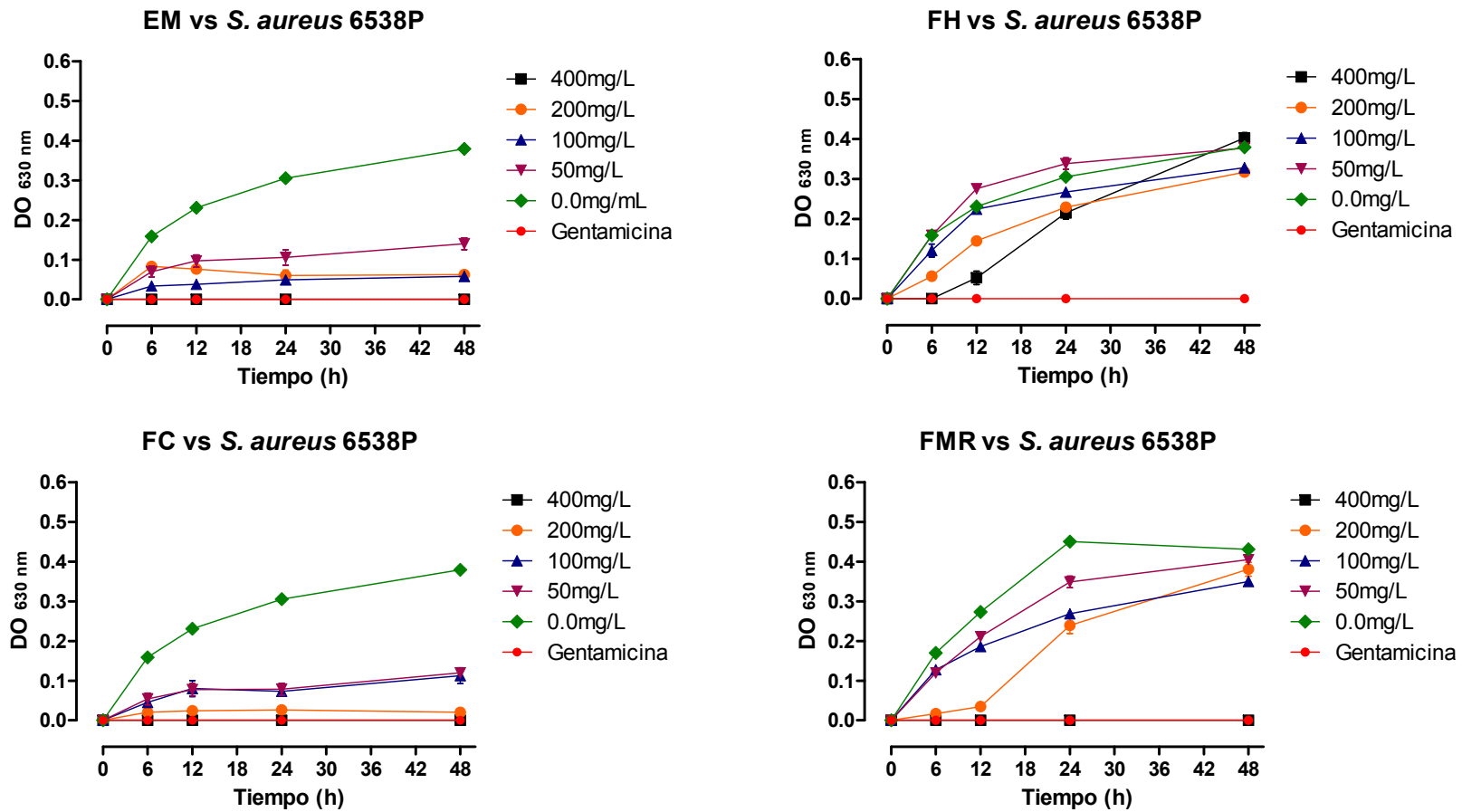
El EM y la FC mostraron importante actividad antibacteriana, inhibiendo el desarrollo de *S. aureus* ATCC6538P, *S. aureus* 157, *E. faecalis* 132 y *E. faecalis* 531. Mientras que las FH y FMR no presentaron actividad antibacteriana importante. En las tablas 5 y 6 se presentan el porcentaje de inhibición del desarrollo bacteriano del EM y la FC, se puede observar como a concentraciones de 200 y 50mg/L la FC es ligeramente más activa que el EM.

El EM inhibió el desarrollo de *S. aureus* ATCC6538P, *S. aureus* 157 con una CMI<sub>90</sub> de 400mg/L y 200mg/L, respectivamente, datos similares reportan Velázquez y colaboradores (2007) en los propóleos de Ures, Caborca y Pueblo de Álamos frente a cepas de colección. Asimismo la FC presentó actividad antibacteriana a una CMI<sub>90</sub> de 200mg/L para ambas cepas. Mientras que la FMR presentó inhibición con una CMI<sub>90</sub> de 400mg/L también para ambas cepas. La FH no mostró actividad antibacteriana. Ver figura 6 y 7.

Tanto el EM como la FC presentaron inhibición del desarrollo de *E. faecalis* 132 y *E. faecalis* 531 a concentraciones de 400mg/L, datos similares reporta Velázquez y colaboradores (2007) en cepas de colección de *E. faecalis*. Mientras que la FH y FMR no mostraron actividad antibacteriana. Ver figura 8 y 9.

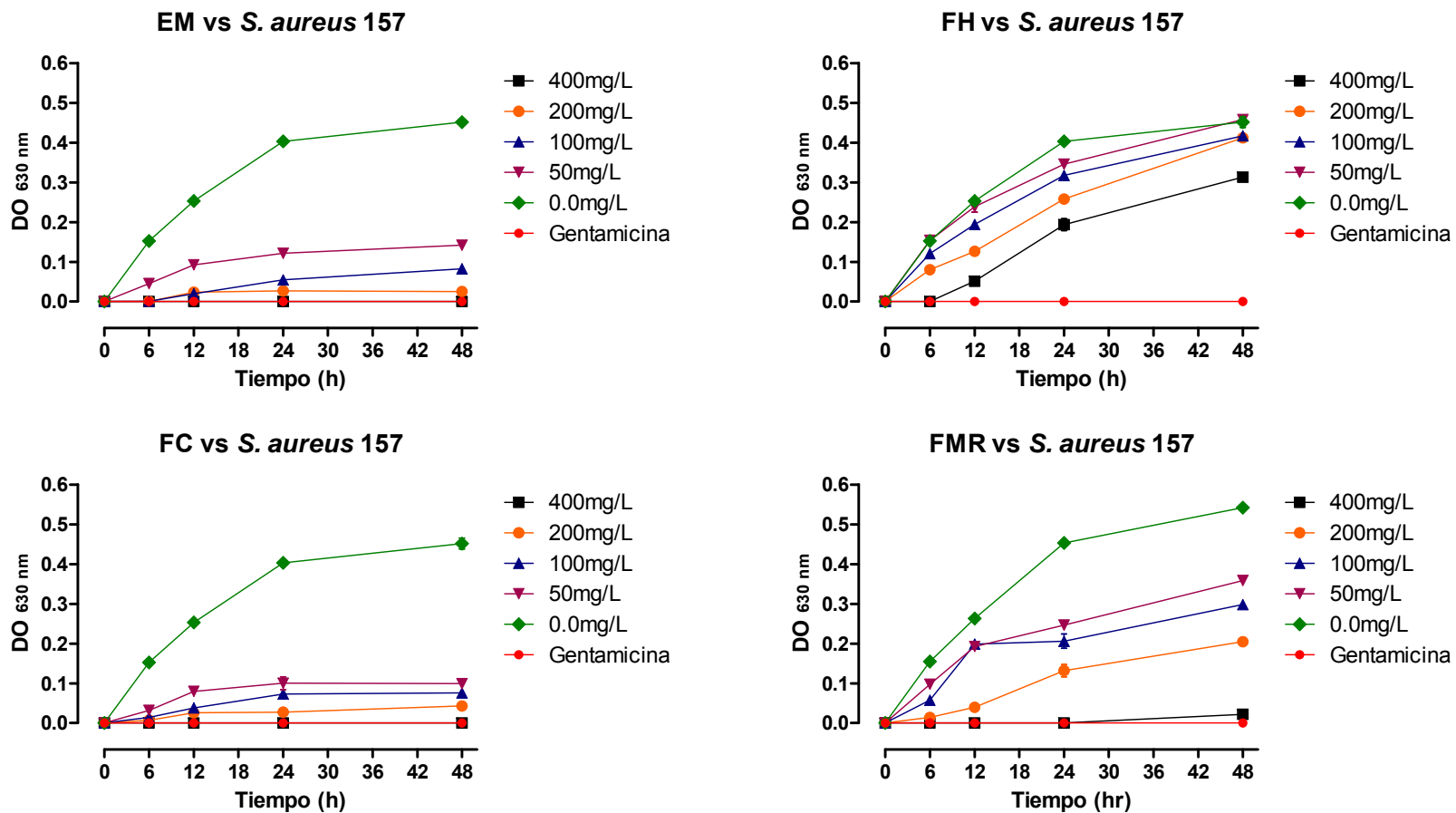
La ausencia de actividad antibacteriana en la FH se debe a que las sustancias extractables en hexano son en su totalidad ceras (Palomino, Martínez y col., 2010). En cuanto a la FMR pierde su actividad conforme se extraen los compuestos con otros solventes en grado creciente de polaridad.

Las diferencias que se observan en la actividad antibacteriana de los propóleos de distintas regiones así como de sus extractos con diferentes solventes, se debe a las diferencias cualitativas y cuantitativas en su composición química, además de las distintas metodologías empleadas para evaluar la actividad (Cushnie y Lamb 2005). En la tabla 7 se muestran las CMI de propóleos de distintas regiones y se puede observar como hay valores de extremo a extremo mientras que los propóleos colombianos necesitan de concentraciones de 15 390 a 17 030mg/L, para inhibir el desarrollo de cepas de *S. aureus* los propóleos provenientes de Turquía lo hacen a concentraciones de 8 a 16mg/L. También se puede observar como difieren las concentraciones para inhibir una cepa de colección de una proveniente de un proceso infeccioso. Se duplica la dosis al doble o hasta más de 4 veces. Como por ejemplo los propóleos del Brasil que presentan una CMI de 102mg/L para una cepas de colección y de 409mg/L para un de origen clínico.



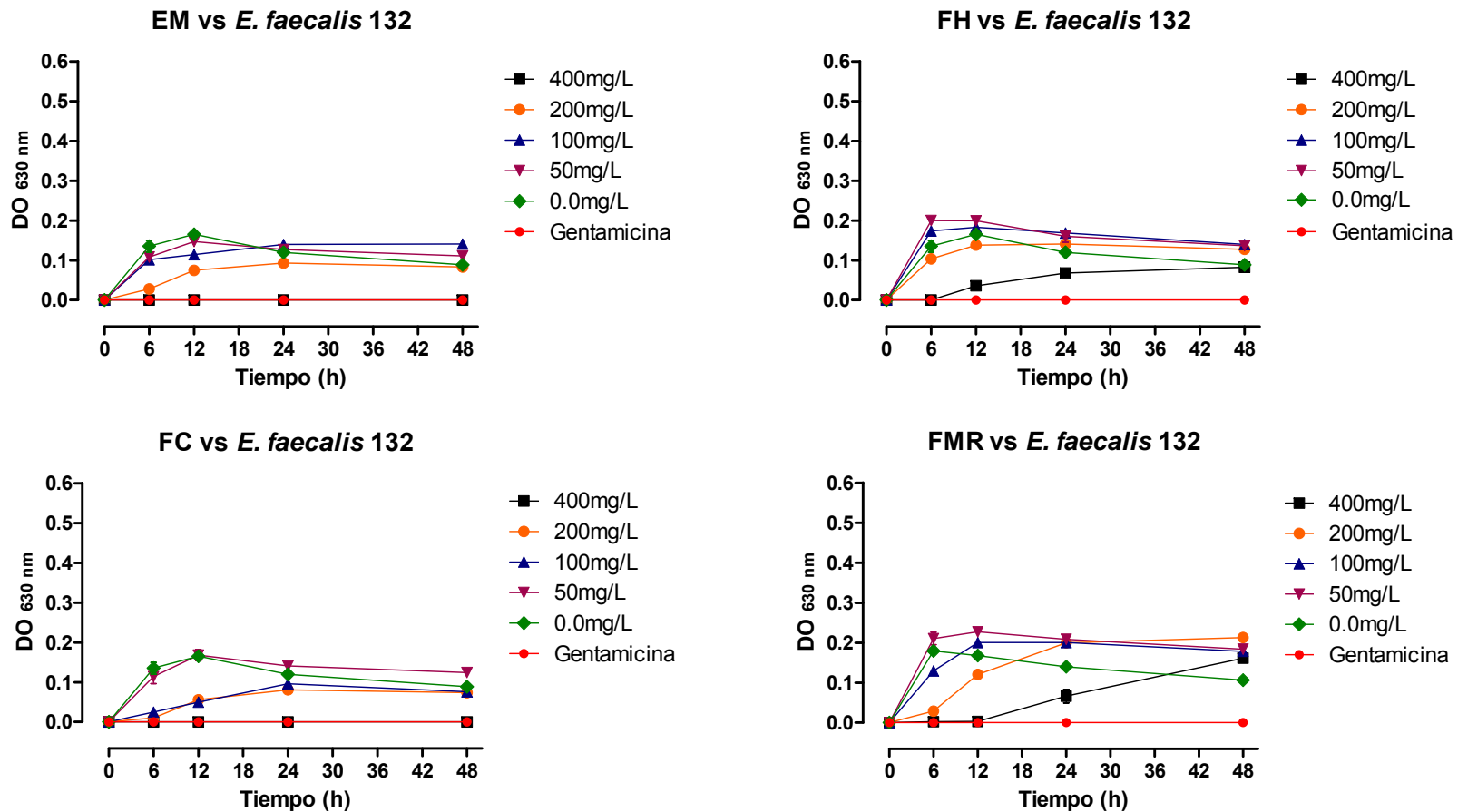
**Figura 6.** Actividad antibacteriana del EM, FH, FC y FMR frente al cultivo de *S. aureus* ATCC6538P.

Los resultados son representativos de al menos tres experimentos independientes. Se graficó la media  $\pm$  desviación estándar de análisis triplicados.



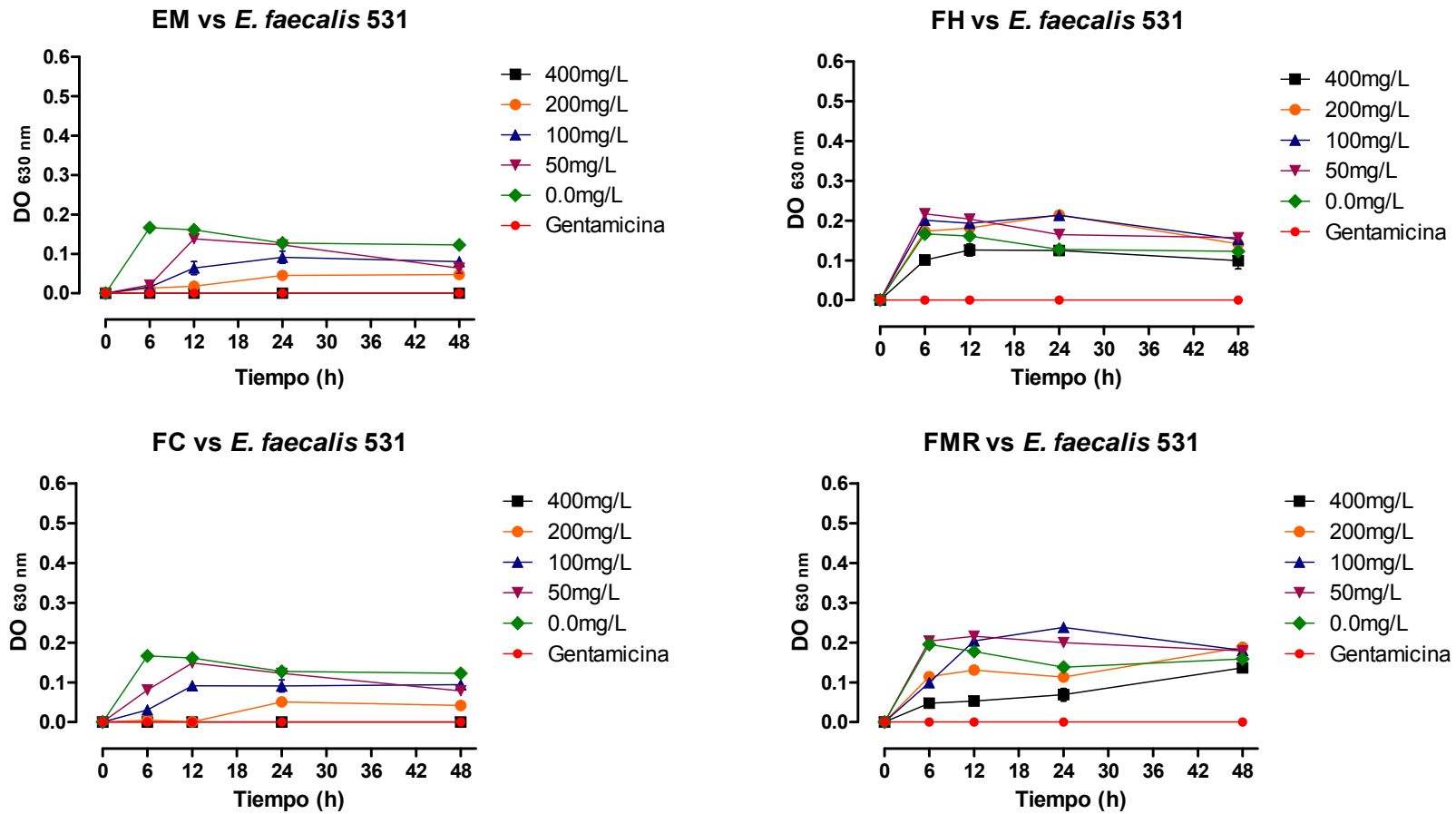
**Figura 7.** Actividad antibacteriana del EM, FH, FC y FMR frente al cultivo de *S. aureus* 157.

Los resultados son representativos de al menos tres experimentos independientes. Se graficó la media  $\pm$  desviación estándar de análisis triplicados.



**Figura 8.** Actividad antibacteriana del EM, FH, FC y FMR frente al cultivo de *E. faecalis* 132.

Los resultados son representativos de al menos tres experimentos independientes. Se graficó la media  $\pm$  desviación estándar de análisis triplicados.



**Figura 9.** Actividad antibacteriana del EM, FH, FC y FMR frente al cultivo de *E. faecalis* 531.

Los resultados son representativos de al menos tres experimentos independientes. Se graficó la media  $\pm$  desviación estándar de análisis triplicados.

**Tabla 4.** Concentración mínima inhibitoria 90% (CMI<sub>90</sub>) del EM, FH, FC y FMR frente a las cepas de *S. aureus* ATCC6538P, *S. aureus* 157, *E. faecalis* 132 y *E. faecalis* 531.

CEPAS	PROPÓLEOS (mg/L)			
	EM	FH	FC	FMR
<i>S. aureus</i> ATCC6538P	400	>400	200	400
<i>S. aureus</i> 157	200	>400	200	400
<i>E. faecalis</i> 132	400	>400	400	>400
<i>E. faecalis</i> 531	400	>400	400	>400



**Tabla 5.** Porcentaje de Inhibición del desarrollo de la cepa de *S. aureus* ATCC6538P, *S. aureus* 157, *E. faecalis* 132 y *E. faecalis* 531 frente a diferentes concentraciones del EM a las 24 horas de incubación.

<b>CEPA</b>	<b>400mg/L</b>	<b>200mg/L</b>	<b>100mg/L</b>	<b>50mg/L</b>
<i>S. aureus</i> ATCC6538P	100%	80%	84%	65%
<i>S. aureus</i> 157	100%	93%	86,5%	70%
<i>E. faecalis</i> 132	100%	22%	0%	0%
<i>E. faecalis</i> 531	100%	64,5%	28%	4%

**Tabla 6.** Porcentaje de Inhibición del desarrollo de la cepa de *S. aureus* ATCC6538P, *S. aureus* 157, *E. faecalis* 132 y *E. faecalis* 531 frente a diferentes concentraciones del FC a las 24 horas de incubación.

<b>CEPA</b>	<b>400mg/L</b>	<b>200mg/L</b>	<b>100mg/L</b>	<b>50mg/L</b>
<i>S. aureus</i> ATCC6538P	100%	91,5%	76%	74%
<i>S. aureus</i> 157	100%	94%	82%	75%
<i>E. faecalis</i> 132	100%	32%	20%	0%
<i>E. faecalis</i> 531	100%	60,5%	28%	4%

**Tabla 7.** Informes de concentración mínima inhibitoria (CMI) de propóleos de distintas regiones.

Propóleos	Cepas bacterianas CMI (mg/L)				Referencia
	<i>S.aureus</i> ATCC	<i>E. faecalis</i> ATCC	<i>S.aureus</i> *	<i>E.faecalis</i> *	
Egipto	2 200-2 600	-	-	-	Hegazi y Abd, 2002
Croacia	-	-	650-5 680	2 330-9 090	Pepeljnjak y Kosalec, 2004
Brasil	102	-	409	-	Salomão y col., 2004
Bulgaria	1 638	-	6 553	-	Salomão y col., 2004
Turquía	8-16	2-32	-	-	Uzel y col., 2005
Turquía	-	-	7,8-281,2	-	Kilic y col., 2005
Sonora, México	100-400	>400	200->400	-	Velázquez y col., 2007
Jordania	585-4 690	-	4 690-18 750	-	Darwish y col., 2010
Sonora, México	200-400				Salcido, 2010
Irak	640-1280	-	-	-	Hendi y col., 2011
Colombia	15 390-17 030	-	-	-	Samara y col., 2011
Sonora, México	200-400		200	400	Resultados obtenidos

\* Muestra clínica.

## 6. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos se concluye que:

1. El propóleo de la región El Arenoso, Sonora presenta actividad antibacteriana contra *S. aureus* y *E. faecalis*.
2. El EM y la FC mostraron la mayor actividad antibacteriana.
3. La cepa de *S. aureus* mostraron ser más sensible a el EM y la FC que las cepas de *E. faecalis*.
4. El EM y la FC presentaron una CMI moderada de 200-400mg/L en la inhibición de *S. aureus*.
5. La FC se mostró ligeramente más activa que el EM.

## 7. RECOMENDACIONES

Para futuras investigaciones sobre el tema se recomienda:

1. Identificar los constituyentes del propóleos de la región El Arenoso.
2. Evaluar la cantidad de flavonoides totales.
3. Determinar la concentración mínima bactericida (CMB).
4. Seguir evaluando la actividad antibacteriana de los propóleos de otras regiones del estado de Sonora, ya que se ha establecido que existe actividad frente a cepas de colección y de las provenientes de procesos infecciosos.
5. Publicar los resultados obtenidos, en revistas internacionales.

## 8. BIBLIOGRAFIA

- Acosta, A. (2007). Actividad biológica y composición química de propóleos Sonorenses. *Tesis de Maestría - Universidad de Sonora*, 1-59.
- Akao, Y., Maruyama, H., Matsumoto, K., Ohguchi, K., Nishizawa, K., Sakamoto, T., Araki, Y., Mishima, S. (2003). Cell growth inhibitory effect of cinnamic acid derivatives from propolis on human tumor cell lines. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 26(7), 1057–1059.
- Amoros, M., Lurton, E., Boustie, J., Girre, L., Sauvager, F., Cormier, M. (1994). Comparison of the anti-herpes simplex virus activities of propolis and 3-methyl-but-2-enylcaffeate. *Journal of Natural Products*, 57(5), 644–647.
- Angulo, A. (2005). Evaluación de la actividad antioxidante y apoptótica de propóleos sonorenses. *Tesis de Diplomado - Universidad de Sonora*, 1-52.
- Bankova, V. (2005). Recent trends and important developments in propolis research. *eCAM*, 2(1), 29-32.
- Bankova, V., Castro, S., Marcucci, M. (2000). Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, 31(1), 3-15.
- Bankova, V., Christov, R., Popov, S., Marcucci, M., Tsvetkova, I., Kujumgiev, A. (1999). Antibacterial activity of essential oils from Brazilian propolis. *Fitoterapia*, 70(2), 190-193.
- Banskota, A. H., Nagaoka, T., Sumioka, L. Y., Tezuka, Y., Awale, S., Midorikawa, K., Matsushige, K., Kadota, S. (2002). Antiproliferative activity of the Netherlands propolis and its active principles in cancer cell lines. *Journal of Ethnopharmacology*, 80(1), 67-73.

- Bogaard, A., Stobberingh, E. (1996). Is it time to ban all antibiotics as animal growth-promoting agents? *Lancet*, 348(1), 1454–1456.
- Boyanova, L., Derejian, S., Koumanova, R., Katsarov, N., Gergova, G., Mitov, I., Nikolov, R., Krastev, Z. (2003). Inhibition of *Helicobacter pylori* growth *in vitro* by Bulgarian propolis: preliminary report. *Journal of Medical Microbiology*, 52(5), 417–419.
- Burdock, G. (1998). Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food Chem Toxicol*, 36(4), 347-63.
- Cabrera, C., Gómez, R., Zúñiga, E. (2007). Resistance to bacterial antibiotics, antiseptics and disinfectants a manifestation of the survival and adaptation mechanisms. *Colombia Médica*, 38(2), 149-158.
- Cunha, B. (2001). Antibiotic side effects. *Medical Clinics of North America*, 85(1), 149-185.
- Cushnie, T., Lamb, A. (2005). Detection of galangin-induced cytoplasmic membrane damage in *Staphylococcus aureus* by measuring potassium loss. *Journal of Ethnopharmacology*, 101(1-3), 243-248.
- Choi, Y., Noh, D., Cho, S., Suh, H., Kim, K., Kim, J. (2006). Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. *LWT - Food Science and Technology*, 39(7), 756–761.
- Darwish, R., Abu, R., Abu, M., Nazer, I. (2010). Antibacterial effect of Jordanian propolis and isolated flavonoids against human pathogenic bacteria. *African Journal of Biotechnology*, 9(36), 5966-5974.
- Das, I., Gray, J. (1998). Enterococcal bacteremia in children: a review of seventy-five episodes in a pediatric hospital. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 17(12), 1154-1158.

- Davidsohn, I., Bernard, J. H. (1998). *Diagnóstico clínico por el laboratorio*. España: Salvat. 985.
- Daza, R. (1998). Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. *Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud*, 22(1), 57-67.
- Díaz, M., Salas, C., Fernández, M., Martínez, A. (2007). Características clínicas y epidemiológicas de las infecciones por enterococos en el niño. *Revista Cubana de Pediatría*, 79(1), Consultado el 01 de septiembre 2011, de [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-75312007000100008&lng=es&nrm=iso](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75312007000100008&lng=es&nrm=iso).
- Díaz, P. M., Rodríguez, C., Zhurbenko, R. (2010). Fundamental features on the *Enterococcus* genus as a very important pathogen at present time. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 48(2), 147-161.
- Domingo, D., López, B. (2003). Plantas con acción antimicrobiana. *Revista Española de Quimioterapia*, 16(1), 385-393.
- Eguizábal, M., Moromi, H. (2007). Actividad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de propóleo peruano sobre *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus casei*. *Odontología Sanmarquina*, 10(2), 18-20.
- Fernández, F., Fuente, J., Rubianes, M., Pérez, S., Álvarez, M., Nodar, A., Pérez, B., Martínez, C. (2004). Bacteremia por *Enterococcus faecalis*. *Revista Clínica Española*, 204(5), 244-250.
- Ferré, R., Frasset, I., Sánchez, A. (2004). El propolis y la salud. *Ars Pharmaceutica*, 45(1), 21-43.
- Fowler, V., Olsen, M., Corey, R., Woods, C., Cabell, C., Reller, L., Cheng, A., Dudley, T., Oddone, E. (2003). Clinical identifiers of complicated



- Staphylococcus aureus* bacteremia. *Archives of Internal Medicine*, 163(17), 2066-2072.
- García, M., Medina, R., Hidalgo, P., Delgado, M., Truffin, E., Gómez, R. (2007). Actividad *in vitro* del propóleo frente a patógenos bacterianos aislados de infecciones humanas. *Latin American Journal of Pharmacy*, 26(1), 100-102.
- Gérvás, J. (2000). La resistencia a los antibióticos, un problema de salud pública. *Atención Primaria*, 25(8), 589-596.
- González, A., Bernal, R. (1997). Propóleos: Un camino hacia la salud. La Habana, Cuba: Pablo de la Torriente. 132.
- Hegazi, A., Abd F. (2002). Egyptian propolis: 3. Antioxidant, antimicrobial activities and chemical composition of propolis from reclaimed lands. *Z. Naturforsch*, 57(3-4), 395-402.
- Hendi, N., Nather H., Al, A. (2011). *In vitro* antibacterial and antifungal activity of Iraqi propolis. *Journal Of Medicinal Plants*, 5(20), 5058-5066.
- Holmberg, S., Wells., Cohen, M. (1984). Animal-to-man transmission of antimicrobial-resistant *Salmonella*: investigations of U.S. outbreaks. 1971-1983. *Science*, 225(1), 833-835.
- Iñigo, G., Soto, J. (2009). Efecto de propoleos de Ures y éster fenilico de ácido cafeico (CAPE) sobre la viabilidad de *Staphylococcus aureus* (ATCC6538P) y *Vibrio cholerae* no O1. *Tesis de Titulación - Universidad de Sonora*, 1-45.
- Kanafani, A., Fowler, G. (2006). *Staphylococcus aureus* infections: new challenges from an old pathogen. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 24(3), 182-93.

- Khayyal, M., Elghazaly, M., Elkhatib, A. (1993). Mechanisms involved in the antiinflammatory effect of propolis extract. *Drugs Under Experimental and Clinical Research*, 19(5), 197–203.
- Kilic, A. B. (2005). *In vitro* antimicrobial activity of propolis against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Annals of Microbiology*, 55(2), 113-117.
- Krell, R. (1996). *Value-added products from beekeeping*. Italia: Food and Agriculture Organization of the United Nations Rome. 160.
- Lalueza, A. (2008). Importancia actual de la bacteremia por “*Staphylococcus aureus*” en un hospital universitario. *Tesis de Doctorado - Universidad Complutense de Madrid*, 99-123.
- Lautenbach, E., Bilker, W., Brennan, P. (1999). Enterococcal bacteremia: risk factors for vancomycin resistance and predictors of mortality. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 20(5), 318-323.
- Li, L., Yue, C., Cheng, C. (2003). Antibacterial and DPPH free radical-scavenging activities of the ethanol extract of propolis collected in Taiwan. *Journal of Food and Drug Analysis*, 11(4), 277-282.
- Lugo, R. (2003). Constituyentes de los propóleos Sonorenses y su actividad antiproliferativa contra líneas celulares transformadas. *Tesis de Maestría - Universidad de Sonora*, 1-72.
- Manrique, A. (2006). Actividad antimicrobiana de propóleos provenientes de dos zonas climáticas del estado Miranda, Venezuela. Efecto de la variación estacional. *Zootecnia Tropical*, 24(1), 43-53.
- Marcucci, M., Ferreres, F., García, C., Bankova, V., Castro, S., Dantas, A., Valente, P., Paulino N. (2001). Phenolic compounds from Brazilian

- propolis with pharmacological activities. *Journal of Ethnopharmacology*, 74(2), 105-112.
- Martínez, P., Muñoz, S., Gutiérrez, M., Arriola, P., Montero, E., Ezpeleta, C., Cisterna, R., Villa, F. (2007). Análisis de 182 episodios de bacteremia por enterococo: estudio de la epidemiología, microbiología y evolución clínica. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 25(8), 503-507.
- Mestanza, F., Pamo, O. (1992). Estudio muestral del consumo de medicamentos y automedicación en Lima Metropolitana. *Revista Médica Herediana*, 3(1), 101-108.
- Moreno, Z., Martínez, P., Figueroa, J. (2007). Efecto antimicrobiano *in vitro* de propóleos argentinos, colombianos y cubano sobre *Streptococcus mutans* ATCC25175. *NOVA*, 5(7), 70-75.
- Mori, A., Nishino, C., Nobuyasu, E., Tawata, S. (1987). Actividad antibacteriana y modo de acción de los flavonoides de las plantas contra *Proteus vulgaris* y *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry*, 26(8), 2231-2234.
- Murray, B. (1990). The life and times of the *Enterococcus*. *Clinical Microbiology Reviews*, 3(1), 46-65.
- Neacato, S. (2005). Uso de extractos etanólicos de propóleo para el control de *Staphylococcus aureus in vitro* obtenidos de leche de vacas con mastitis. *Tesis de Titulación - Escuela Politécnica del Ejército*, 1-91.
- Nilforoushzadeh, M., Shirani, L., Zolfaghari, A., Saberi, S., Siadat, A., Mahmoudi, M. (2008). Comparison of *Thymus vulgaris* (Thyme), *Achillea millefolium* (Yarrow) and propolis hydroalcoholic extracts versus systemic

- glucantime in the treatment of cutaneous leishmaniasis in balb/c mice. *Journal of Vector Borne Diseases*, 45(4), 301-306.
- Ordóñez, M., Vera, N., Bedescarrabure, E., Maldonado, L., Isla, M. (2007). Análisis comparativo del perfil químico de muestras de propóleos de Calingasta, San Juan, obtenidos por diferentes métodos de recolección y épocas del año. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 6(5), 266-267.
- Orsi, R., Sforcin, J., Rall, V., Funari, S., Barbosa, L., Fernandes, JR. (2005). Susceptibility profile of *Salmonella* against the antibacterial activity of propolis produced in two regions of Brazil. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 11(2), 109-116.
- Palomino, L. (2009). Caracterización fisicoquímica y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos de Antioquia. *Tesis de Maestría - Universidad Nacional de Colombia*, 22-27.
- Palomino, L., Martínez, J., García, C., Gil, J., Durango, D. (2010). Caracterización fisicoquímica y actividad antimicrobiana del propóleos en el municipio de La Unión (Antioquia, Colombia). *Revista Facultad Nacional de Agronomía*, 63(1), 5373- 5383.
- Peña, R. (2008). Estandarización en propóleos: antecedentes químicos y biológicos. *Ciencia e Investigación Agraria*, 35(1), 17-26.
- Pepeljnjak, S., Kosalec, I. (2004). Galangin expresses bactericidal activity against multiple-resistant bacteria: MRSA, *Enterococcus spp.* and *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiology Letters*, 240(1), 111-116.
- Philippe, J. (1990). Guía del apicultor. España: Mundiprensa. 245-246;323-325.

- Popova, M., Silici, S., Kaftanoglu, O., Bankova, V. (2005). Antibacterial activity of Turkish propolis and its qualitative and quantitative chemical composition. *Phytomedicine*, 12, 221–228.
- Quiroga, E., Sampietro, D., Soberon, J., Sgariglia, M., Vattuone, M. (2006). Propolis from the northwest of Argentina as a source of antifungal principles. *Journal of Applied Microbiology*, 101(1), 103–110.
- Salcido, M. (2010). Determinación de la actividad antibacteriana y antioxidante en propóleos de dos regiones de Sonora. *Tesis de Titulación. Caborca*, 1-57.
- Salomão, K., Dantas, A., Borba, C., Campos, L., Machado, D., Aquino, F., Castro, S. (2004). Chemical composition and microbicidal activity of extracts from Brazilian and Bulgarian propolis. *Letters in Applied Microbiology*, 38(2), 87–92.
- Samara, N. Benítez, N., Cabezas F. (2011). Actividad antibacteriana y composición cualitativa de propóleos provenientes de dos zonas climáticas del departamento del Cauca. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustria*, 9(1), 8-16.
- Schleifer, H., Kilpper, R. (1984). Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom.rev.as *Enterococcus faecalis* comb.nov. and *Enterococcus faecium* comb.nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 34(1), 31-34.
- Sforcin, J., Fernandes, A., Lopes, C., Bankova, V., Funaria, S. (2000). Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 73(1-2), 243-249.

- Sofiysky, W. (2002). *Guía medicinal de los productos de apicultura*. Rusia: Yema. 153-162.
- Stosor, V., Peterson, L., Postelnick, M., Noskin, G. (1998). *Enterococcus faecium* Bacteremia. *Archives of Internal Medicine*, 158(1), 522-52.
- Takaisikikuni, N., Schilcher, H. (1994). Electron microscopic and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance. *Planta Medica*, 60(3), 222-227.
- Tolosa, L., Cañizares, E. (2002). Obtención, caracterización y evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos de Campeche. *Ars Pharmaceutica*, 43(1-2), 187-204.
- Trusheva, B., Popova, M., Naydenski, H., Tsvetkova, I., Rodriguez, J. G., Bankova, V. (2004). New polyisoprenylated benzophenones from Venezuelan propolis. *Fitoterapia*, 75(7-8), 683-689.
- Uzel, A., Sorkun, K., Önçağ, Ö., Çoğulu, D., Gençay, Ö., Sali'h. (2005). Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. *Microbiological Research*, 160(2), 189-195.
- Velázquez, C., Navarro, M., Acosta, A., Angulo, A., Domínguez, Z., Robles, R., Robles, Z. R., Lugo, E., Goycoolea, M., Velázquez, F., Astiazaran, H., Hernández, J. (2007). Antibacterial and free-radical scavenging activities of Sonoran propolis. *Journal of Applied Microbiology*, 103(5), 1747–1756.
- Velázquez, M. (2005). Surgimiento y diseminación de *Staphylococcus aureus* meticilinoresistente. *Salud Pública de México*, 47(5), 381-387.
- Velázquez, N., Viguera, J., Escalona, G., Arellano, J., Giono, S., Nava, M. (2009). Resistance to linezolid in methicillin-resistant *Staphylococcus*

*aureus* and *Enterococcus* with high-level resistance to aminoglycosides in a third-level pediatric hospital. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*, 47(1), 19-26.

Yoong, A. (2004). Caracterización físico-química del propóleo de la Escuela Agrícola Panamericana y su efecto antioxidante en aceite de soya. *Tesis de Titulación - Escuela Agrícola Panamericana*, 1-50.

## 9. APÉNDICE

### 9.1. Preparación de la solución concentrada y de las soluciones de trabajo del EM

#### Solución concentrada

##### Reactivos

- Dimetil sulfóxido (DMSO) estéril
- Extracto Metanólico (EM)

##### Material

- Tubo eppendorf estéril
- Espátula en punta
- Puntas estériles para micropipeta
- Micropipeta de volumen variable de 100-1000 $\mu$ L

##### Equipo

- Balanza analítica
- Vortex

##### Procedimiento

1. Pesar el tubo eppendorf.
2. Pesar la cantidad necesaria del extracto (45-55mg).
3. Llevar a un volumen final de 1mL con DMSO.



4. Agitar en vortex.
5. Etiquetar.
6. Determinar la concertación final:
  - a. Peso de la muestra de EM = 0,4504g = 45 040mg/L.

### **Soluciones de trabajo de 400, 200, 100 y 50mg/L**

#### **Reactivo**

Solución concentrada de EM (45 040mg/L)

Caldo Mueller Hinton (CMH)

#### **Material**

Placa de 12 pozos

Puntas estériles para micropipeta

Micropipeta de volumen variable de 100-1000µL

Micropipeta de volumen variable de 10-100µL

#### **Equipo**

- Campana de flujo laminar

#### **Procedimiento**

1. Hacer los cálculos para determinar la cantidad de solución concentrada que se requiere para tener una concentración de 400mg/L:

$$Y = C_i/C_f$$

$$C_i = 45\ 040\text{mg/L}$$

$$C_f = 400\text{mg/L}$$

$$Y = 45\ 040\text{mg/L} / 400\text{mg/L}$$

$$Y = 112,6$$

$$V_i = V_f/Y$$

$$V_f = 6\text{mL}$$

$$V_i = 6\text{mL} / 112,6$$

$$V_i = \mathbf{53\mu\text{L}}$$

Se requieren de 53 $\mu\text{L}$  de solución concentrada de EM + 5 947 $\mu\text{L}$  de CMH, para obtener una concentración de 400mg/L.

2. Se agregan 6mL del CMH al primer pozo de la primera fila de la placa de 12 pozos y 3mL a los pozos restantes de la primera fila. Ver apéndice 5.
3. Se retiran 53 $\mu\text{L}$  del volumen de 6mL y se adicionan 53 $\mu\text{L}$  de la solución concentrada del EM.
4. Se mezcla.
5. Se traspasan 3mL de un pozo a otro. Ver apéndice 5.

**Nota:** este procedimiento se realizó en la campana de flujo laminar.

## 9.2. Preparación de la solución concentrada y de las soluciones de trabajo de la FH

### Solución concentrada

#### Reactivos

- Dimetil sulfóxido (DMSO) estéril
- Fracción Hexánica (FH)

#### Material

- Tubo eppendorf estéril
- Espátula en punta
- Puntas estériles para micropipeta
- Micropipeta de volumen variable de 100-1000 $\mu$ L

#### Equipo

- Balanza analítica
- Vortex

#### Procedimiento

1. Pesar el tubo eppendorf.
2. Pesar la cantidad necesaria de la fracción (45-55mg).
3. Llevar a un volumen final de 1mL con DMSO.
4. Agitar en vortex.
5. Etiquetar.

6. Determinar la concertación final:

a) Peso de la muestra de FH = 0,4548g = 45 480mg/L.

### **Soluciones de trabajo de 400, 200, 100 y 50mg/L**

#### **Reactivo**

Solución concentrada de FH (45 480mg/L)

Caldo Mueller Hinton (CMH)

#### **Material**

Placa de 12 pozos

Puntas estériles para micropipeta

Micropipeta de volumen variable de 100-1000µL

Micropipeta de volumen variable de 10-100µL

#### **Equipo**

- Campana de flujo laminar

#### **Procedimiento**

1. Hacer los cálculos para determinar la cantidad de solución concentrada que se requiere para tener una concentración de 400mg/L:

$$Y = C_i/C_f$$

$$C_i = 45\,480\text{mg/L}$$

$$C_f = 400\text{mg/L}$$

$$Y = 45\,480\text{mg/L} / 400\text{mg/L}$$

$$Y = 113,7$$

$$V_i = V_f/Y$$

$$V_f = 6\text{mL}$$

$$V_i = 6\text{mL} / 113,7$$

$$V_i = \mathbf{53\mu\text{L}}$$

Se requieren de 53 $\mu\text{L}$  de solución concentrada de FH + 5 947 $\mu\text{L}$  de CMH, para obtener una concentración de 400mg/L.

2. Se agregan 6mL del CMH al primer pozo de la tercera fila de la placa de 12 pozos y 3mL a los pozos restantes de la tercera fila. Ver apéndice 5.
3. Se retiran 53 $\mu\text{L}$  del volumen de 6mL y se adicionan 53 $\mu\text{L}$  de la solución concentrada del FH.
4. Se mezcla.
5. Se traspasan 3mL de un pozo a otro. Ver apéndice 5.

**Nota:** este procedimiento se realizó en la campana de flujo laminar.

### **9.3. Preparación de la solución concentrada y de las soluciones de trabajo de la FC**

#### **Solución concentrada**

##### **Reactivos**

- Dimetil sulfóxido (DMSO) estéril
- Fracción Clorofórmica (FC)

##### **Material**

- Tubo eppendorf estéril
- Espátula en punta
- Puntas estériles para micropipeta
- Micropipeta de volumen variable de 100-1000 $\mu$ L

##### **Equipo**

- Balanza analítica
- Vortex

##### **Procedimiento**

1. Pesar el tubo eppendorf.
2. Pesar la cantidad necesaria de la fracción (45-55mg).
3. Llevar a un volumen final de 1mL con DMSO.
4. Agitar en vortex.
5. Etiquetar.

6. Determinar la concertación final:

a) Peso de la muestra de FC = 0,4794g = 47 940mg/L.

### **Soluciones de trabajo de 400, 200, 100 y 50mg/L**

#### **Reactivo**

Solución concentrada de FC (47 940mg/L)

Caldo Mueller Hinton (CMH)

#### **Material**

Placa de 12 pozos

Puntas estériles para micropipeta

Micropipeta de volumen variable de 100-1000µL

Micropipeta de volumen variable de 10-100µL

#### **Equipo**

- Campana de flujo laminar

#### **Procedimiento**

1. Hacer los cálculos para determinar la cantidad de solución concentrada que se requiere para tener una concentración de 400mg/L:

$$Y = C_i/C_f$$

$$C_i = 47\,940\text{mg/L}$$

$$C_f = 400\text{mg/L}$$

$$Y = 47\,940\text{mg/L} / 400\text{mg/L}$$

$$Y = 119,85$$

$$V_i = V_f/Y$$

$$V_f = 6\text{mL}$$

$$V_i = 6\text{mL} / 119,85$$

$$V_i = \mathbf{50\mu\text{L}}$$

Se requieren de 50 $\mu\text{L}$  de solución concentrada de FC + 5 950 $\mu\text{L}$  de CMH, para obtener una concentración de 400mg/L.

2. Se agregan 6mL del CMH al primer pozo de la segunda fila de la placa de 12 pozos y 3mL a los pozos restantes de la segunda fila. Ver apéndice 5.
3. Se retiran 50 $\mu\text{L}$  del volumen de 6mL y se adicionan 50 $\mu\text{L}$  de la solución concentrada del FC.
4. Se mezcla.
5. Se traspasan 3mL de un pozo a otro. Ver apéndice 5.

**Nota:** este procedimiento se realizó en la campana de flujo laminar.



#### **9.4. Preparación de la solución concentrada y de las soluciones de trabajo de la FMR**

##### **Solución concentrada**

##### **Reactivos**

- Dimetil sulfóxido (DMSO) estéril
- Fracción Metanólica Residual (FMR)

##### **Material**

- Tubo eppendorf estéril
- Espátula en punta
- Puntas estériles para micropipeta
- Micropipeta de volumen variable de 100-1000 $\mu$ L

##### **Equipo**

- Balanza analítica
- Vortex

##### **Procedimiento**

1. Pesar el tubo eppendorf.
2. Pesar la cantidad necesaria de la fracción (45-55mg).
3. Llevar a un volumen final de 1mL con DMSO.
4. Agitar en vortex.
5. Etiquetar.

6. Determinar la concertación final:

a) Peso de la muestra de FMR = 0,2998g = 29 980mg/L.

### **Soluciones de trabajo de 400, 200, 100 y 50mg/L**

#### **Reactivo**

Solución concentrada de FMR (29 980mg/L)

Caldo Mueller Hinton (CMH)

#### **Material**

Placa de 12 pozos

Puntas estériles para micropipeta

Micropipeta de volumen variable de 100-1000µL

Micropipeta de volumen variable de 10-100µL

#### **Equipo**

- Campana de flujo laminar

#### **Procedimiento**

1. Hacer los cálculos para determinar la cantidad de solución concentrada que se requiere para tener una concentración de 400mg/L:

$$Y = C_i/C_f$$

$$C_i = 29\,980\text{mg/L}$$

$$C_f = 400\text{mg/L}$$

$$Y = 29\,980\text{mg/L} / 400\text{mg/L}$$

$$Y = 75$$

$$V_i = V_f/Y$$

$$V_f = 6\text{mL}$$

$$V_i = 6\text{mL} / 75$$

$$V_i = \mathbf{80\mu\text{L}}$$

Se requieren de 80 $\mu\text{L}$  de solución concentrada de FMR + 5 920 $\mu\text{L}$  de CMH, para obtener una concentración de 400mg/L.

2. Se agregan 6mL del CMH al primer pozo de la primera fila de la placa de 12 pozos y 3mL a los pozos restantes de la primera fila. Ver apéndice 5.
3. Se retiran 80 $\mu\text{L}$  del volumen de 6mL y se adicionan 80 $\mu\text{L}$  de la solución concentrada del FRM.
4. Se mezcla.
5. Se traspasan 3mL de un pozo a otro. Ver apéndice 5.

**Nota:** este procedimiento se realizó en la campana de flujo laminar.

## 9.5. Preparación de la solución de trabajo de gentamicina

### Solución de trabajo de 120mg/L

#### Reactivo

Solución de gentamicina (50 000mg/L)

Caldo Mueller Hinton (CMH)

#### Material

Tubo falcón estéril

Puntas estériles para micropipeta

Micropipeta de volumen variable de 100-1000 $\mu$ L

Micropipeta de volumen variable de 10-100 $\mu$ L

#### Equipo

- Campana de flujo laminar

#### Procedimiento

1. Hacer los cálculos para determinar la cantidad de solución de gentamicina que se requiere para tener una concentración de 120mg/L:

$$Y = C_i/C_f$$

$$C_i = 50\,000\text{mg/L}$$

$$C_f = 120\text{mg/L}$$

$$Y = 50\,000\text{mg/L} / 120\text{mg/L}$$

$$Y = 416,66$$

$$V_i = V_f/Y$$

$$V_f = 5\text{mL}$$

$$V_i = 5\text{mL} / 416,66$$

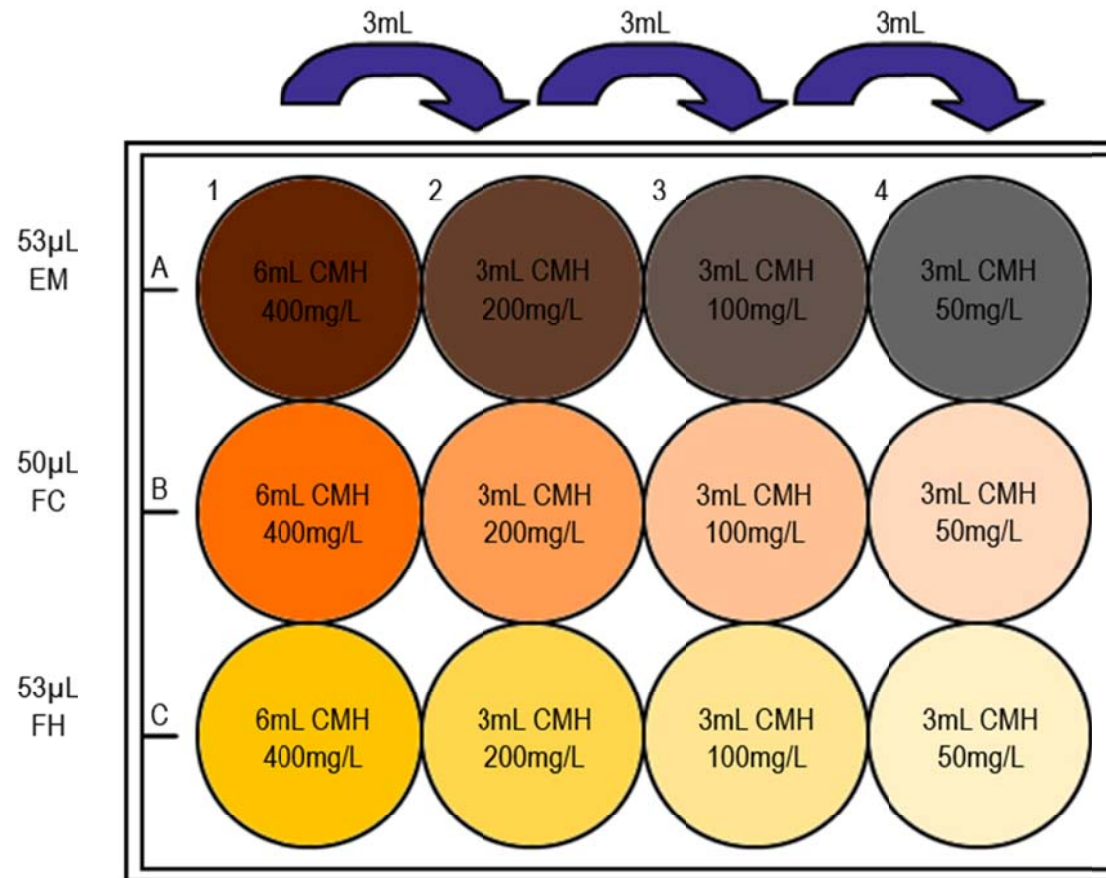
$$V_i = 12\mu\text{L}$$

Se requieren de 12 $\mu\text{L}$  de solución de gentamicina + 5 988 $\mu\text{L}$  de CMH, para obtener una concentración de 120mg/L.

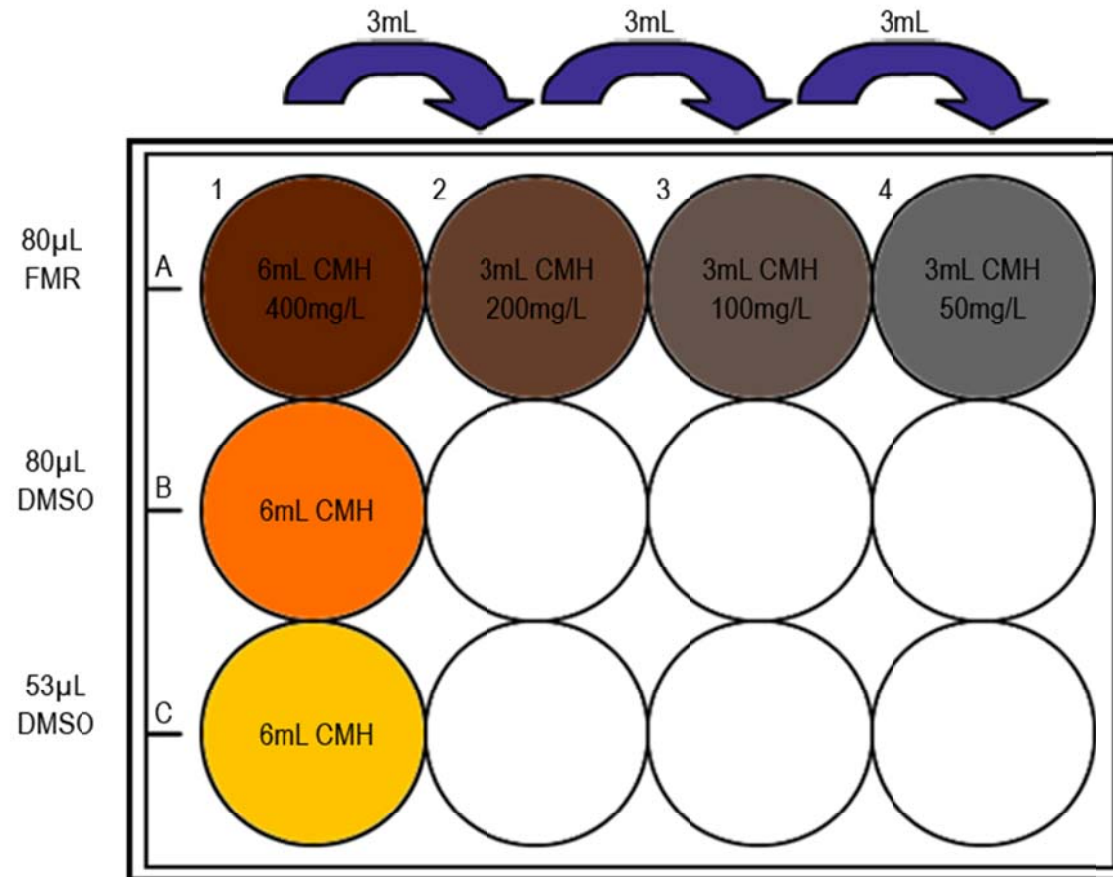
2. A 5mL del CMH se le retiran 12 $\mu\text{L}$  del volumen y se adicionan 12 $\mu\text{L}$  de la solución de gentamicina.

**Nota:** En los pozos de prueba de la microplaca de fondo plano se realizó una dilución 1:10, mezclando 20 $\mu\text{L}$  de solución de trabajo de gentamicina con 180 $\mu\text{L}$  de Caldo Mueller Hinton, para obtener una concentración final en el pozo de prueba de 12mg/L. Este procedimiento se realizó en la campana de flujo laminar.

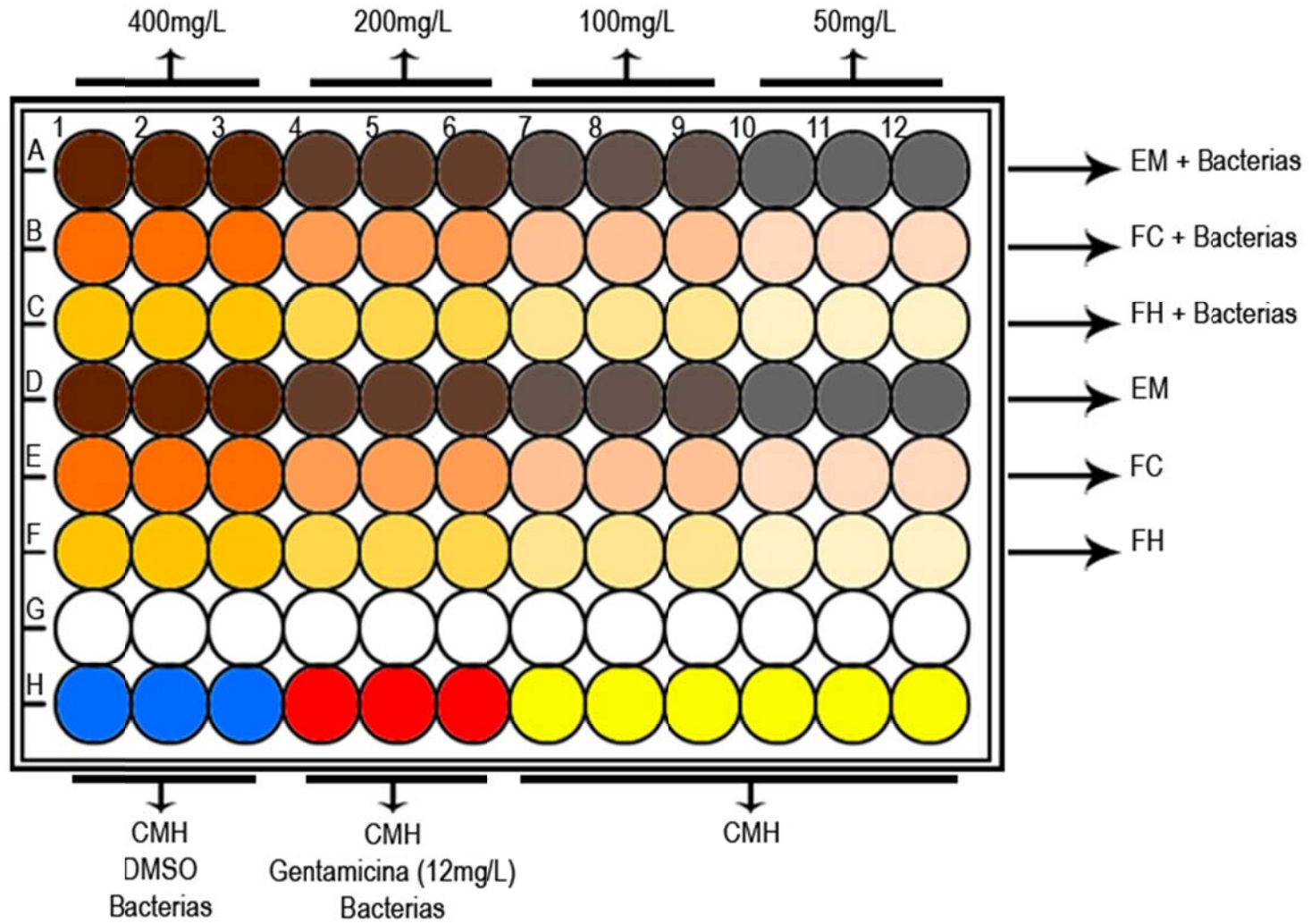
9.6. Distribución de las muestras para la preparación de las soluciones de trabajo en la placa de 12 pozos del EM, FC y FH



9.7. Distribución de las muestras para la preparación de las soluciones de trabajo en la placa de 12 pozos del FMR



9.8. Distribución de las muestras (EM, FC y FH) en la placa de 96 pozos de fondo plano





9.9. Distribución de las muestras (FMR) en la placa de 96 pozos de fondo plano

