

ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
“GRAD. CARLOMAGNO ANDRADE PAREDES”

USO DE EXTRACTOS ETANOLICOS DE PROPÓLEO
PARA EL CONTROL DE *Staphylococcus aureus* IN VITRO
OBTENIDOS DE LECHE DE VACAS CON MASTITIS.

SEGUNDO FERNANDO NEACATO VINUEZA

INFORME TÉCNICO DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN PRESENTADO
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL TÍTULO DE INGENIERO
AGROPECUARIO

SANGOLQUÍ – ECUADOR

2005

USO DE EXTRACTOS ETANOLICOS DE PROPÓLEO
PARA EL CONTROL DE *Staphylococcus aureus* IN VITRO
OBTENIDOS DE LECHE DE VACAS CON MASTITIS

SEGUNDO FERNANDO NEACATO VINUEZA

REVISADO Y APROBADO

Cnrl. ESP DR. Giovanni Granda

Dr. Darwin Rueda
DIRECTOR INVESTIGACIÓN
INVESTIGACIÓN

Dr. Joar García
CODIRECTOR

Ing. Agr. Gabriel Suárez
BIOMETRISTA

CERTIFICO QUE ESTE TRABAJO FUE PRESENTADO EN ORIGINAL
(ELECTROMAGNÉTICAMENTE) E IMPRESO EN DOS EJEMPLARES

Dr. Marco Peñaherrera
SECRETARIO ACADÉMICO

USO DE EXTRACTOS ETANOLICOS DE PROPÓLEO
PARA EL CONTROL DE *Staphylococcus aureus* IN VITRO
OBTENIDOS DE LECHE DE VACAS CON MASTITIS

SEGUNDO FERNANDO NEACATO VINUEZA

APROBADO POR LOS SEÑORES MIEMBROS DEL TRIBUNAL DE
CALIFICACIÓN DEL INFORME TÉCNICO

	CALIFICACIÓN	FECHA
Dr. Darwin Rueda DIRECTOR DE INVESTIGACIÓN	_____	_____
Dr. Joar García CODIRECTOR INVESTIGACIÓN	_____	_____

CERTIFICO QUE ESTAS CALIFICACIONES FUERON PRESENTADAS EN
ESTA SECRETARIA.

Dr. Marco Peñaherrera
SECRETARIO ACADÉMICO

DEDICATORIA

A todos los que tuvieron el justo sueño de ser mejor, pero en este país donde la educación es un privilegio, y no un derecho, no han podido lograrlo.

A todos los que de una u otra forma me ayudaron a culminar este largo camino.

A mis padres que con su ejemplo me ayudaron a no dar mi brazo a torcer en momentos difíciles y de abatimiento.

A mis colaboradores con quienes logramos hacer la primera empresa estudiantil productora de alimentos del IASA “El buen producto”.

A los miembros del CIDE que nos ayudaron a que no se nos cierre las puertas de la ESPE y poder vender nuestros productos.

A mi hermana y cuñado que siempre tuvieron tiempo para ayudarme.

A la mujer de mi vida que aunque no esta conmigo la llevo siempre en mi corazón.

A Dios a quien no acabo de entender.

AGRADECIMIENTO

Gracias Señor

Gracias señor
 Por haberme hecho
 Conocer el Ecuador
 De Norte a Sur, de
 Este a Oeste, de frente
 Y de perfil, a sus
 Pueblos, desde el
 Barrio alto a los
 Suburbios, a su gente
 Desde científicos a
 Analfabetos, por ver
 Sus ojos llenos de
 Esperanza, de preocupación
 Por llevar algo de pan
 A sus hogares,
 Por ver en cada
 Uno de ellos algo
 De ti, de tu amor
 De tu paciencia de

Tu severidad
 Por mis compañeros
 Con quienes compartimos
 Tristezas y quebrantos
 Alegrías y furor
 Gran parte de nuestras vidas
 Por toda la gente que
 De una u otra forma
 Nos apoyaron
 Por mis padres
 Que me acompañaron siempre.

Por mis profesores quienes nos
 Compartieron gran parte de sus vidas
 Para lograr que nosotros aprendamos.

Gracias Señor por todo lo vivido

Y al reunir las cualidades
 De toda esta gente, no cabe duda
 De que seamos hijos tuyos.

CONTENIDO

		Pág.
I.	INTRODUCCIÓN	12
II.	REVISIÓN DE LITERATURA	15
	A. PROPÓLEO	15
	1. <u>Naturaleza, origen y recolección del propóleo por las Abejas.</u>	15
	2. <u>Teorías sobre la procedencia del propóleo.</u>	16
	3. <u>Historia y procedencia del nombre del “propóleo”.</u>	18
	4. <u>Procedencia de su composición, origen botánico y propiedades físicas.</u>	20
	5. <u>Estudios terapéuticos realizados sobre propóleo.</u>	29
	6. <u>Acción y actividad biológica del propóleo.</u>	31
	7. <u>Propiedades antimicrobianas.</u>	33
	8. <u>Comparación de la acción de propóleos de abejas nativas ecuatorianas (trigonas meliponas) con los de <i>Apis mellifera</i> (abeja productiva introducida).</u>	34
	9. <u>Actividad antiviral.</u>	35
	10. <u>El propóleo en la apiterapia.</u>	36
	11. <u>Listado de aplicaciones en medicina Humana.</u>	37
	12. <u>Alergia al Propóleo.</u>	37
	13. <u>Curiosidades históricas del propóleo.</u>	38

B. ESTAFILOCOCOS	39
1. <u>Clasificación de los estafilococos.</u>	39
2. <u>Propiedades de los estafilococos.</u>	39
C. <i>Staphylococcus aureus</i>	39
1. <u>Patología.</u>	
2. <u>Mastitis causada por <i>Staphylococcus aureus</i>.</u>	40
	40
D. QUIMIOTERÁPIA Y ANTIBIÓTICOTERAPIA.	42
1. <u>Modo de acción de los antibióticos.</u>	
2. <u>Antibiogramas.</u>	
3. <u>Resistencia a los antibióticos.</u>	44
	45
	46
III MATERIALES Y MÉTODOS	47
A. MATERIALES	
1. <u>Materiales de campo.</u>	49
2. <u>Materiales de laboratorio.</u>	
	49
	49
B. MÉTODOS	49
1. <u>Factores en estudio.</u>	
2. <u>Tratamientos.</u>	
3. <u>Procedimiento.</u>	52
	52
	52
	54
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	65
A. <u>Radio del halo de inhibición.</u>	65
V. CONCLUSIONES	78
VI. RECOMENDACIONES	79
VII. RESUMEN	82
VIII. SUMMARY	85
IX. BIBLIOGRAFÍA	88
X. ANEXOS	91

INDICE DE CUADROS

		Pág.
CUADRO 1.	FLAVONAS ASOCIADAS A LA ACTIVIDAD APÍCOLA.	24
CUADRO 2.	FLAVONOLES ASOCIADOS A LA ACTIVIDAD APÍCOLA.	25
CUADRO 3.	ANTOCIANIDINAS ASOCIADOS A LA ACTIVIDAD APÍCOLA.	25
CUADRO 4.	FLAVONAS ASOCIADAS A LA ACTIVIDAD APÍCOLA.	26
CUADRO 5.	TRATAMIENTOS Y COMBINACIÓN DE LOS DOS FACTORES EN ESTUDIO.	53
CUADRO 6.	ESQUEMA DEL ANÁLISIS DE VARIANCIA.	54
CUADRO 7.	ESCALA NEFELOMÉTRICA DE Mc FARLAND, PROPORCIONES DE SUS CONSTITUYENTES.	62
CUADRO 8.	ANÁLISIS DE VARIANCIA PARA EL RADIO DEL HALO DE INHIBICIÓN DE LOS ANTIBIOGRÁMAS BAJO EL EFECTO DE LOS NIVELES DE PROPÓLEO Y CONCENTRACIONES DE BACTERIAS.	65
CUADRO 9.	PROMEDIOS DEL RADIO DEL HALO DE INHIBICIÓN BAJO EL EFECTO DE NIVELES DE PROPÓLEO Y TESTIGOS.	67
CUADRO 10.	PROMEDIOS DEL RADIO DEL HALO DE INHIBICIÓN BAJO EL EFECTO DE NIVELES DE CONCENTRACIÓN DE BACTERIAS.	68
CUADRO 11.	PROMEDIOS DEL RADIO DEL HALO DE INHIBICIÓN BAJO EL EFECTO CONJUNTO PROPÓLEO Y CONCENTRACIONES DE BACTERIAS.	70
CUADRO 12.	PROMEDIOS DEL RADIO DEL HALO DE INHIBICIÓN DE LOS ANTIBIOGRÁMAS BAJO EL EFECTO DE LOS NIVELES DE PROPÓLEO Y TESTIGOS PARA	

	CADA UNA DE LAS CONCENTRACIONES DE BACTERIAS.	72
CUADRO 13.	CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) DE PROPÓLEO EN <i>Staphylococcus aureus</i> .	75

INDICE DE FIGURAS

Fig.1	PROCESO DE TRANSFORMACIÓN DE FLAVONAS A FLAVONAS, FLAVONONAS, FLAVONOIDES.	23
Fig.2	ORÍGEN SINTÉTICO DE LOS PRINCIPALES GRUPOS DE COMPUESTOS SECUNDARIOS.	24
Fig.3	EJEMPLO DE FENILPROPANOS NATURALES PRESENTES EN EL PROPÓLEO.	24
Fig.4	ESTRUCTURA DE ALGUNOS FLAVONOIDES Y COMPUESTOS RELACIONADOS.	25
Fig.5	RADIO DEL HALO DE INHIBICIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS PROBADOS EN mm.	69
Fig.6	PROMEDIO DEL HALO DE INHIBICIÓN BAJO EL EFECTO DE NIVELES DE CONCENTRACIÓN DE BACTERIAS.	70
Fig.7	PROMEDIOS DEL RADIO DEL HALO DE INHIBICIÓN BAJO EL EFECTO CONJUNTO DE PROPÓLEO Y CONCENTRACIONES DE BACTERIAS.	72
Fig. 8	PROMEDIO DEL RADIO DEL HALO DE INHIBICIÓN DE LOS ANTIBIOGRAMAS BAJO EL EFECTO DE LOS NIVELES DE PROPÓLEO Y TESTIGOS, PARA LA Y CONCENTRACIÓN 0.5 Mc FARLAND DE BACTERIAS.	74
Fig. 9	PROMEDIO DEL RADIO DEL HALO DE INHIBICIÓN DE LOS ANTIBIOGRAMAS BAJO EL EFECTO DE LOS NIVELES DE PROPÓLEO Y TESTIGOS, PARA LA Y CONCENTRACIÓN 5 Mc FARLAND DE BACTERIAS.	74

Fig. 10 PROMEDIO DEL RADIO DEL HALO DE INHIBICIÓN DE LOS ANTIBIOGRAMAS BAJO EL EFECTO DE LOS NIVELES DE PROPÓLEO Y TESTIGOS, PARA LA Y CONCENTRACIÓN 9 Mc FARLAND DE BACTERIAS.

75

INDICE DE FOTOS

- FOTO 1. ANTIBIOGRAMA PARA *Staphylococcus aureus* CON ANTIBIÓTICOS COMERCIALES EN LA QUE SE DETERMINÓ A LA CIPROFLOXACINA COMO TESTIGO COMERCIAL O QUÍMICO. 92
- FOTO 2. ANTIBIOGRAMAS DE LA DILUCIÓN DE EXTRACTO DE PROPÓLEO AL 25 % EN UNA CONCENTRACIÓN DE IZQUIERDA A DERECHA DE: 0.5, 5, 9 DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS (UFC) EN LA ESCALA NEFELOMÉTRICA DE Mc FARLAND. 92
- FOTO 3. ANTIBIOGRAMAS DE LA DILUCIÓN DE EXTRACTO DE PROPÓLEO AL 50 % EN UNA CONCENTRACIÓN DE IZQUIERDA A DERECHA DE: 0.5, 5, 9 DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS (UFC) EN LA ESCALA NEFELOMÉTRICA DE Mc FARLAND. 93
- FOTO 4. ANTIBIOGRAMAS DEL EXTRACTO 100 % PURO DE PROPÓLEO EN UNA CONCENTRACIÓN DE IZQUIERDA A DERECHA DE: 0.5, 5, 9 DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS (UFC) EN LA ESCALA NEFELOMÉTRICA DE Mc FARLAND. 93
- FOTO 5. ANTIBIOGRAMAS DE CIPROFLOXACINA, EN UNA CONCENTRACIÓN DE IZQUIERDA A DERECHA DE: 0.5,

5, 9 DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS (UFC)
EN LA ESCALA NEFELOMÉTRICA DE Mc FARLAND. 93

FOTO 6. ANTIBIOGRAMAS DE ETANOL 96 ° (TESTIGO
ABSOLUTO) EN UNA CONCENTRACIÓN DE IZQUIERDA
A DERECHA DE: 0.5, 5, 9 DE UNIDADES FORMADORAS
DE COLONIAS (UFC) EN LA ESCALA NEFELOMÉTRICA
DE Mc FARLAND. 94

I INTRODUCCIÓN

El propóleo se define como un conjunto de sustancias resinosas, gomosas y balsámicas, de consistencia viscosa, de color pardo rojizo o amarillo verdoso producida por las abejas a partir de resinas vegetales, particularmente de las flores y los brotes de la hoja. Este material se encuentra a la entrada de la colmena, disminuyendo la entrada del viento, el frío y de los enemigos naturales de las abejas. También se utiliza en el interior de la colmena para soldar cuadros, tapar agujeros, para embalsamar pequeños animales muertos dentro de la colmena y que las abejas no pueden sacar, etc.

Desde tiempos remotos y en la actualidad, es conocido y empleado por sus propiedades terapéuticas. Aristóteles, Plinio y Avicena han citado en sus escritos sus cualidades curativas y cicatrizantes en heridas, supuraciones, abscesos y furúnculos.

Con el descubrimiento de la penicilina (1928) y el advenimiento de los antibióticos modernos, se lo comenzó a dejar de lado y paradójicamente, en la actualidad esa tendencia ha comenzado a revertirse. Cuanto más se avanza en el descubrimiento de antibióticos más poderosos, más se necesitan conocer las propiedades terapéuticas del propóleo, que a través de sus extractos parciales o totales, se ha mostrado efectivo contra cepas de gérmenes patógenos que ya adquirieron resistencia a los antibióticos tradicionales y que curiosamente con el tiempo no han mostrado resistencia al propóleo.

“El propóleo no es un accidente de la naturaleza, sino un agente protector y medicinal desarrollado por los árboles durante millones de años.” (Asís, 1996).

La mastitis es una inflamación de la glándula mamaria, puede aparecer como mastitis subclínica, es decir sin síntomas apreciables, o bien como mastitis clínica, con signos evidentes de la enfermedad.

Las mastitis causadas por *Staphylococcus aureus* son extremadamente difíciles de controlar por el tratamiento solamente, estos colonizan extremos del pezón o lesiones anormales del pezón. Sus toxinas destruyen las membranas de las células y pueden dañar directamente la leche producida en el tejido fino, la formación de cicatrices y abscesos dan muestra de una respuesta pobre al tratamiento antibiótico. Las células alveolares y de los conductos, pueden ser destruidas, reduciendo así la producción de leche (Jones, *et al*,1998).

La situación se torna mas crítica en el caso de *Staphylococcus aureus*, que en recientes investigaciones demostró resistencia a mas de 200 antibióticos.

Staphylococcus aureus Produce una enzima que hace inactivos a la mayoría de los tratamientos basados en penicilina, dando como resultado la ineficacia de estos antibióticos. Jones, *et al.* (1998).

Este trabajo pretende elaborar extractos etanólicos de propóleo para determinar su acción bactericida y/o bacteriostática en el control de *Staphylococcus aureus*, in vitro el cual será aislado de vacas enfermas con

mastitis, esta acción será comparada con un antibiótico comercial y además se determinará la concentración mínima inhibitoria del extracto de propóleo frente a esta bacteria.

Las empresas farmacéuticas, grandes transnacionales y muchos mal llamados científicos consideran únicamente antibióticos a los productos que ellos crean y producen y por décadas han despreciado a otros productos que la naturaleza nos brinda y que han demostrado hasta la saciedad su eficacia. Al contraste de esto, los países de Europa Oriental, Asia y Cuba en América, han desarrollado medicinas alternativas, que no producen efectos secundarios ni pérdidas económicas en el caso de su uso veterinario, y con el efecto del propóleo han generado: extractos, elixiers, tinturas, pomadas, ungüentos, caramelos, inyectables, de uso externo e interno, humano y veterinario, que se han mostrado más eficaces que muchos de los productos auspiciados por estas grandes transnacionales. Todos estos potenciales productos apícolas se encuentran ausentes en el mercado ecuatoriano y nuestra producción apícola se ha visto subutilizada al no conocer los demás derivados de la abeja. Con esta investigación se pretende dar al propóleo la importancia que merece, constatar su calidad como antibiótico, fomentar su producción e industrialización, y generar inquietudes para nuevas investigaciones en el campo agropecuario. “Todo lo necesario fue hecho por Dios y con eso es suficiente”.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

A. PROPÓLEO

1. Naturaleza, origen y recolección del propóleo por las abejas

El propóleo se define como un conjunto de sustancias resinosas, gomosas y balsámicas, de consistencia viscosa, de color pardo rojizo o amarillo verdoso producida por las abejas a partir de resinas vegetales, particularmente de las flores y los brotes de la hoja. El origen botánico de la sustancia resinosa recolectada puede ser detectado determinando los granos de polen que contiene, granos de polen idénticos a los de las mieles del mismo origen. Y que tiende a oscurecerse, de algunas especies en particular por las abejas *Apis mellífera*, se considera que la costumbre que tienen las abejas de utilizar el propóleo para protegerse de sus enemigos y recubrir los interiores de la colmena, se remonta a la época en que vivían en estado salvaje en los bosques, en los troncos de los árboles y en cuevas que la transportan al interior de la colmena, modificándola en parte con sus secreciones (ceras y secreciones salivares).(Philippe,1990).

Cuando la abeja encuentra el propóleo en una yema, trata de desprenderlo, valiéndose de sus mandíbulas y con ayuda de su primer par de patas. Esta labor es bastante dura, pero la secreción de las glándulas mandibulares (ácido 10-hidroxi-2-decenoico) permitirá el ablandamiento del propóleo. Luego la abeja tritura con sus mandíbulas el pedazo arrancado y, utilizando una de las patas del segundo par, lo trasfiere a cestilla de la pata posterior del mismo lado; esta operación

puede realizarla estando aún sobre la yema o en pleno vuelo. A continuación llena la cestilla de la otra pata. Para llenar las dos cestillas la abeja trabajará entre 15 minutos y 1 hora, lo cual depende de la temperatura ambiente (una temperatura alta le facilita mucho el trabajo). Ella incluso, puede interrumpir su faena y volver un momento a la colmena para tomar alimentos. (Sofiysky, 2002).

2. Teorías sobre la procedencia del propóleo

Existen dos teorías sobre la procedencia del propóleo elaborado por las abejas. Una teoría dice que el propóleo es recolectado por las abejas de más de 15 días que, con sus mandíbulas, toman las partículas resinosas que hay sobre las yemas de diferentes plantas como el álamo, sauce, abedul, aliso, castaño silvestre, pino, enebro y algunas plantas herbáceas. Después de sujetar la partícula resinosa, la abeja mueve hacia atrás la cabeza hasta que logra desprenderla, almacenándola con sus patas en los cestitos del polen. Las enzimas de su boca participan también en la operación para evitar su adherencia. Cuando llega a la colmena con la carga, otras obreras le ayudan a descargar el propóleo, misión que llega a durar varias horas. Si el material no es bastante maleable, la abeja recolectora se instala en la piquera, donde espera a que el calor del sol ablande la carga y pueda desprenderse mejor de ella. Los vuelos que realiza la abeja desde la colmena a la planta portadora de resina duran de 15 a 20 minutos, y la época de máxima recolección tiene lugar a final de verano. Otra teoría sobre el origen del propóleo manifiesta que se trata de un producto resultante de la digestión del polen y que se efectúa en un pequeño órgano que la abeja posee entre el buche y el intestino medio.

Cuando la abeja entra en la colmena con su carga de propóleo, se dirige al lugar donde éste es necesario y permanece quieta. Mientras, otra obrera se le acerca, toma algunas partículas de la sustancia y las coloca en el lugar deseado, las comprime y les agrega cera. Este proceso de descarga del propóleo puede durar entre una y varias horas, lo cual depende de las necesidades de propóleo en la colmena. (Root, 2002).

Las abejas recolectoras del propóleo (llamadas propolizadoras) nunca depositan sus propias cargas. Cuando quedan libres de sus cargas regresan inmediatamente en busca de más propóleo. En las regiones templadas ellas trabajan de 10:00 a. m. a 4:00p.m., aproximadamente; cuando hay mucho calor comienzan más temprano y están trabajando hasta más tarde. En el otoño intensifican la recogida de propóleo.

Muy a menudo las abejas propolizadoras no entran en la colmena y se procede a la descarga en la piquera. Si se caen algunas partículas de propóleo las abejas no se preocupan por estas.

La cantidad de propóleo recogido y fabricado por las abejas varía según la raza y también según la flora. Así, las abejas caucásicas producen mucho más propóleo que las otras razas, y antes del invierno taponan con propóleos la entrada de la colmena, no dejando más que un agujerito para su paso. En una misma raza la cantidad recolectada varía con el tipo de flora. Las colmenas contienen más propóleos en los bosques que en las regiones de cultivos en que la flora es en su mayoría anual. El colmatado de los sobrecuadros, de los bordes de las alzas y de los

rebordes de los cuadros por una capa de propóleo sobre sus superficies de apoyo es un obstáculo para las visitas a los colmenares y para la recolección de miel.

Varios autores han observado que en la colmena es un número muy pequeño de abejas el que se entrega a la recolección de resina y a la fabricación de propóleo. (Prost, 1989)

3. Historia y procedencia del nombre del “propóleo”

Etimológicamente su nombre deriva del griego "pro" que significa en defensa de; y "polis" que significa ciudad, indicando de esta manera que el material se encuentra a la entrada de la colmena, disminuyendo la entrada del viento, el frío y de los enemigos naturales de las abejas. También se utiliza en el interior de la colmena para soldar cuadros, tapar agujeros, para embalsamar pequeños animales muertos dentro de la colmena y que las abejas no pueden sacar, etc.

Desde tiempos remotos, es conocido y empleado por sus propiedades terapéuticas Aristóteles, Plinio y Avicena han citado en sus escritos sus cualidades curativas y cicatrizantes en heridas, supuraciones, abscesos y furúnculos. La referencia más antigua data del antiguo Egipto, sus sacerdotes usaban el propóleo para embalsamar a los faraones, las celebres momias se conservan hasta nuestros días. En el primer libro médico, Libro de preparación de medicamentos para todas las partes del cuerpo humano, en el papiro de Ebers (escrito aproximadamente en el 1700 a.n.e.), se mencionan la cera y el propóleo (cera negra) como medicamentos. (Philippe,1990).

En el Tanaj (Biblia) se habla del propóleo con otro nombre (tzorí). Primero, cuando José es vendido a los ismaelitas que iban a Galaad (Guilad) a Egipto, se dice que la caravana de camellos llevaba perfumes, bálsamo (propóleo) y mirra (Génesis 37:25). Luego, cuando Jacob pide a sus hijos que le lleven al primer ministro de Egipto (José, alias Tzafnat Panéaj) como regalo lo mejor que hubiera en el país de Canaán, menciona en este orden “un poco de bálsamo (tzorí) y un poco de miel, perfumes, mirra, pistachos, y almendras”(Génesis 43:11).

Los profetas hebreos lo mencionan como bálsamo de Galaad o Judea, o simplemente le llaman resina (tzori), para uso médico (Jeremias 8:22 ; 46:11 y 51:8, Ezequiel 27:17) y se hace referencia a que era un importante producto en el comercio de los antiguos reinos de Judá e Israel, al igual que el trigo , la miel y el aceite.

Los incas lo utilizaban cuando se presentaba un cuadro de infecciones febriles y en el continente europeo se utiliza por los franceses en los siglos XIV y XVIII para el tratamiento de llagas. (Asís, 1996.)

Su máximo empleo se dio durante la guerra de los boers, en África del sur, alrededor de 1900, en el tratamiento de heridas infectadas y como sustancia cicatrizante.

Su uso fue intensificado durante la Segunda Guerra Mundial por la ex-URSS para el tratamiento de heridas. (Philippe, 1990).

Según Metzner, Bekemeier, Paintz y Schneidewind (1979), citado por Philie J., las propiedades bacterianas del propóleo pueden atribuirse sobre todo a los flavonoides que contiene , como la pinocembrina, la galangina, la pinobanksina, el acetato 3-pinobanksina ,y también a una mezcla de éter bencil de ácido p-cumárico y éter del ácido cafeico.

Con el descubrimiento de la penicilina (1928) y el advenimiento de los modernos antibióticos, se comenzó a dejar de lado y paradójicamente, en la actualidad esa tendencia ha comenzado a revertirse. Cuanto más se avanza en el descubrimiento de antibióticos más poderosos, más se necesitan conocer las propiedades terapéuticas del propóleo, que a través de sus extractos parciales o totales, se ha mostrado efectivo contra cepas de gérmenes patógenos que ya adquirieron resistencia a los antibióticos tradicionales y que curiosamente con el tiempo no han mostrado resistencia al propóleo. (Asís, 1996.)

“El propóleo no es un accidente de la naturaleza, sino un agente protector y medicinal desarrollado por los árboles durante millones de años.” (Asís, 1996).

4. Procedencia de su composición, origen botánico y propiedades físicas.

Este polímero balsámico resinoso de las abejas, contiene fundamentalmente, cera y aceites esenciales, y es una sustancia muy compleja, soluble en alcohol y en

solventes tales como éter, acetona, benceno, tricloroetileno y otros. (Langstroth, 1995)

Por su consistencia los componentes presentes en los propóleos, pueden clasificarse dentro de dos grupos, los de naturaleza fluida, los bálsamos y oleorresinas. Las esencias fluidas son agentes volátiles; los bálsamos son de consistencia más densa, poco volátiles y con frecuencia sufren reacciones de polimerización, mientras que las oleorresinas llevan asociado el aroma de las plantas en forma concentrada, son líquidos viscosos o sustancias semisólidas de consistencia cauchosa. La solubilidad depende de la forma en que se encuentren y el número y clase de sustituyentes presentes. El propóleo presenta una consistencia variable, dependiendo 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 varía 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. (Asís, 1996.).

Su composición es compleja, se han identificado cerca de 200 compuestos diferentes.

Resinas y bálsamos.....	50-55 %
Cera.....	25-35 %
Aceites Volátiles.....	10 %
Polen.....	5 %
Sustancias orgánicas y minerales.....	5 %

Entre estas últimas se han detectado:

a. Ácidos orgánicos: ácido benzoico y ácido gálico. Ácidos fenoles: ácido caféico, ácido cinámico, ácido fenílico, ácido insofenílico, ácido p-cumanílico. Aldehidos aromáticos: vainillina, isovainillina. Cumarinas: esculetol, escopoletol.

b. Flavonoides.- Son derivados de flavonas, como polifenolas y éteres metílicos. En las plantas los flavonoides se encuentran en la forma unida en los glucósidos y en forma libre en el propóleo. Los liberan las enzimas de la saliva de las abejas. Los flavonoides libres presentan fuertes propiedades antibacterianas.

- Flavonas: acacetina, crisina amarilla, pectolinarigenina, tectocrisina.

- Flavonoles: galangina, izalqinina, kaempférido, quercetina, ramnocitrina.

- Flavononas: pinostrobina, sakuranetina.

c. Minerales: Aluminio, plata, bario, boro, cromo, cobalto, cobre, estaño, hierro, magnesio, manganeso, molibdeno, níquel, plomo, selenio, silicio, estroncio, titanio, vanadio, zinc. Los propóleos presentan diferencias significativas en la composición de los minerales, condición que podría contribuir al establecimiento de su origen biogeográfico.

d. Vitaminas: Provitamina A, vitamina B3, otras del grupo B.

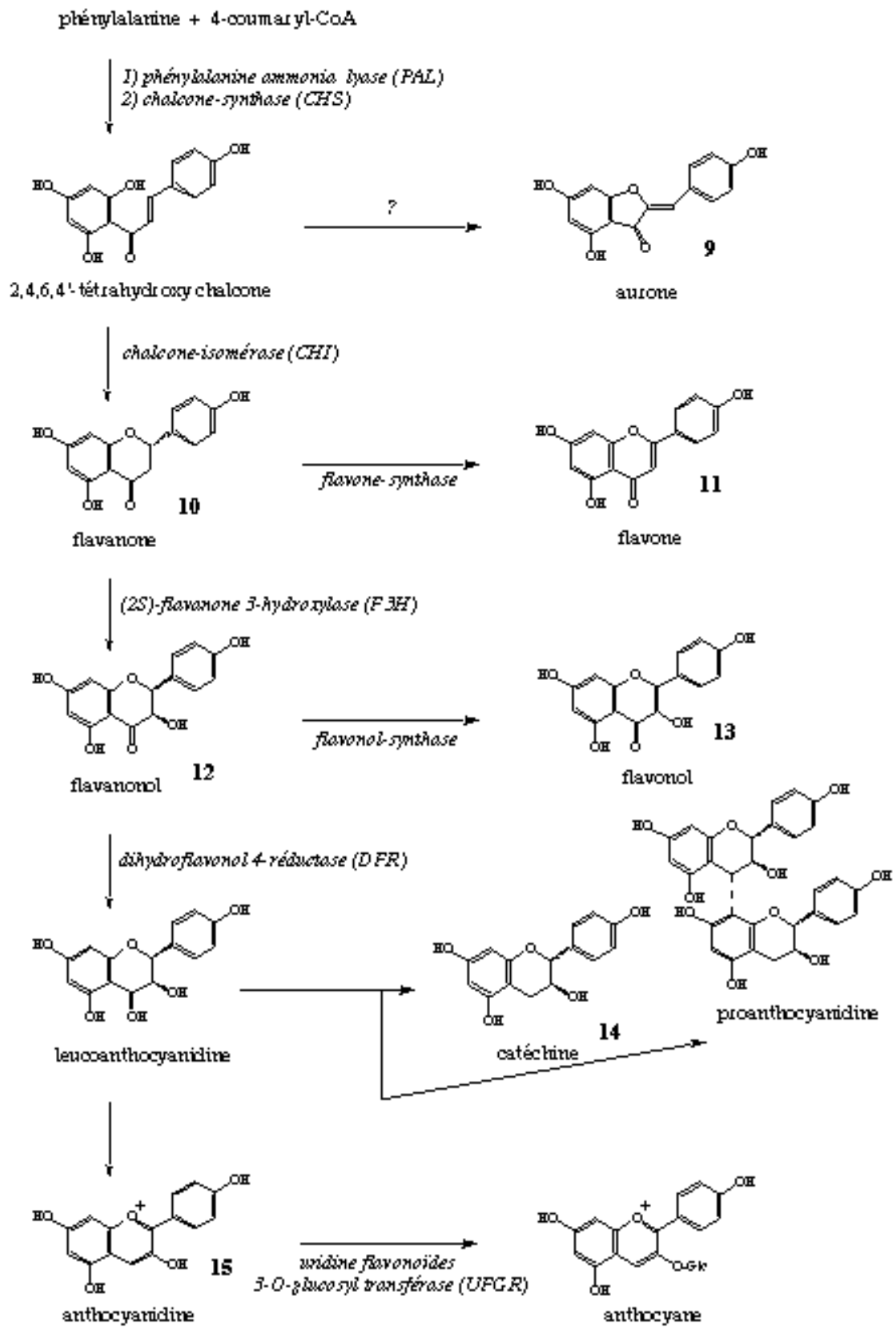


Fig. 1 Proceso de transformación de flavonas a flavononas, flavonoles

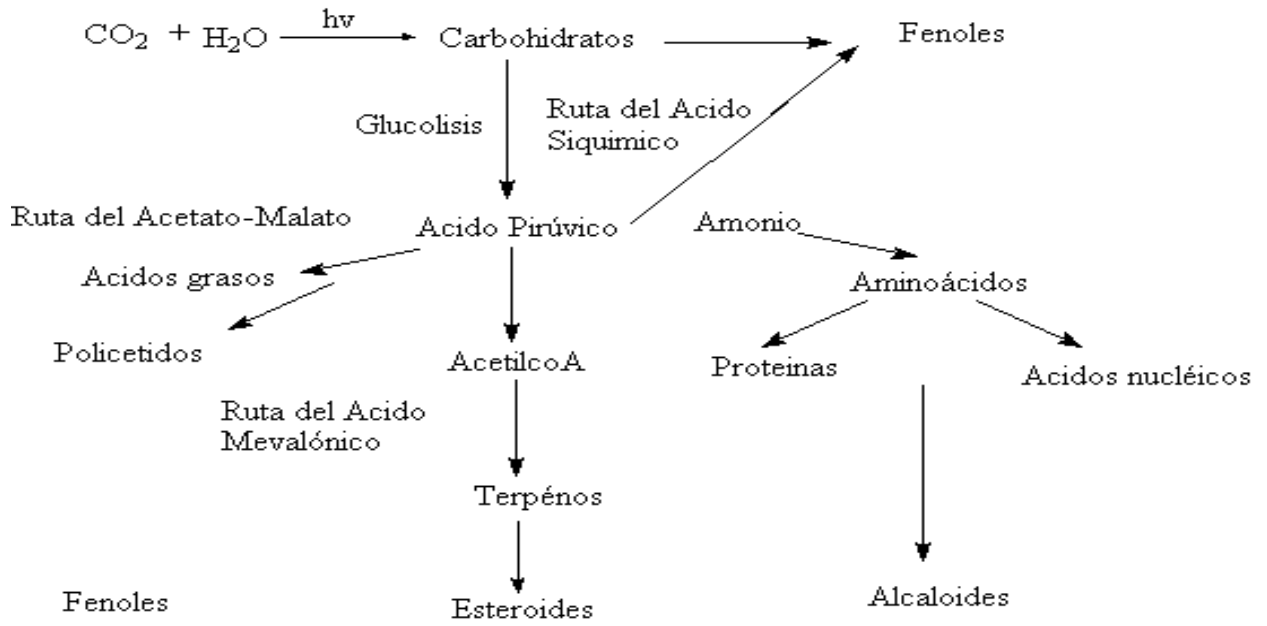


Fig. 2 Origen biosintético de los principales grupos de compuestos secundarios

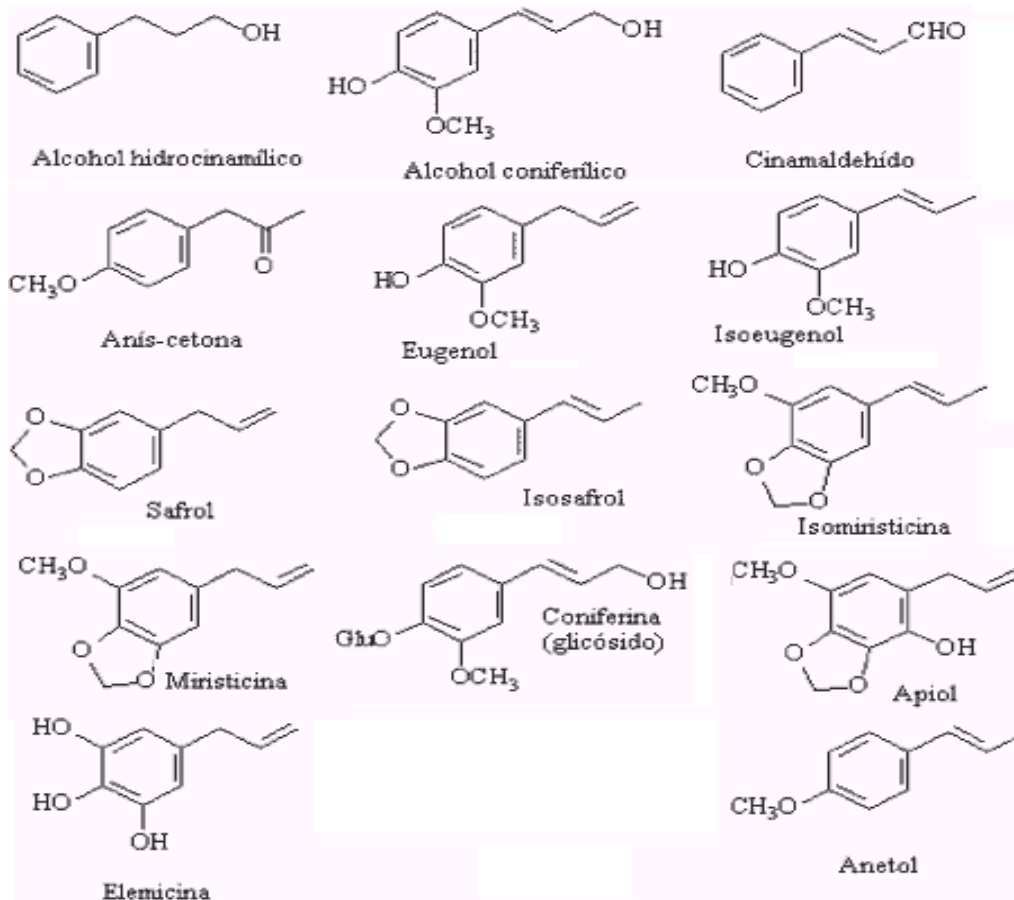


Fig. 3 Ejemplos de fenilpropanos naturales presentes en propóleo

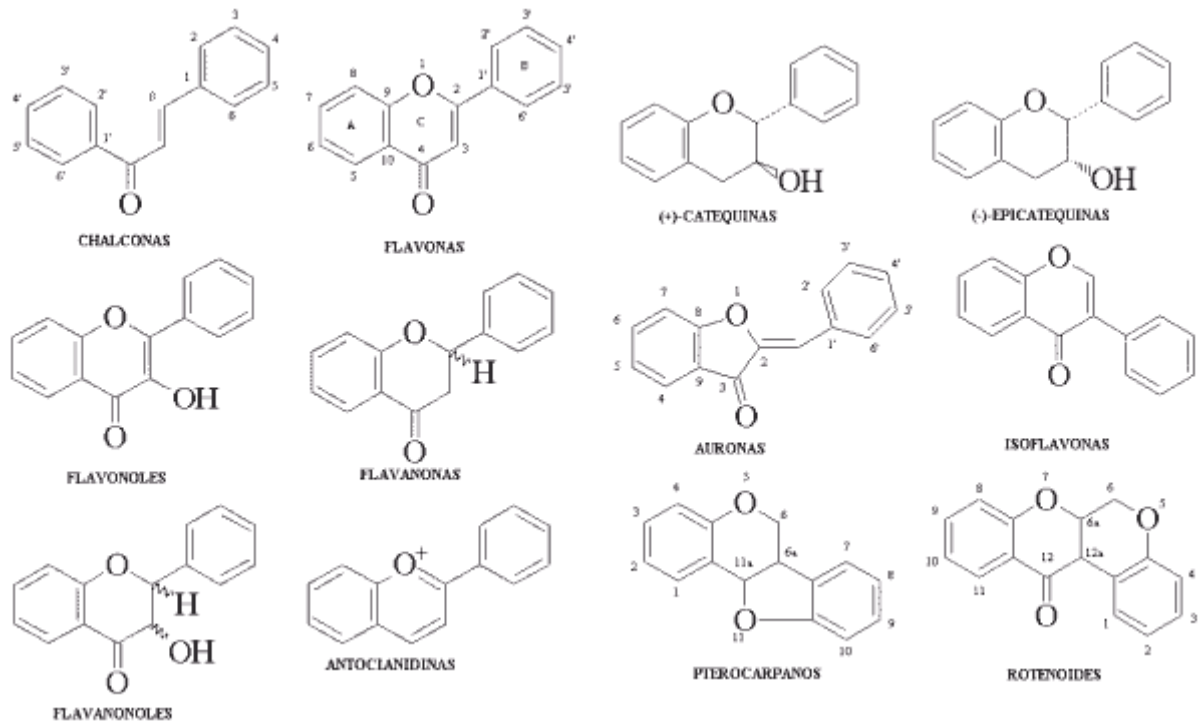
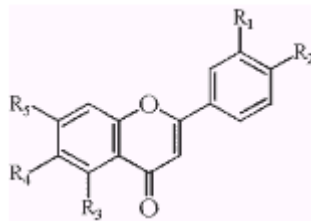
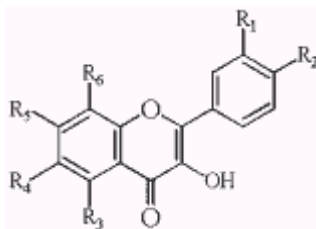


Fig. 4 Estructura de algunos flavonoides y compuestos relacionados



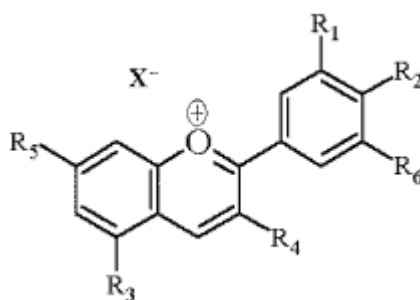
Cuadro 1. Flavonas asociadas a la actividad apícola

Nombre vernáculo	R1	R2	R3	R4	R5	Fuente
<i>Apigenina</i>	-	OH	OH	-	OH	<i>Petroselinum</i>
<i>Crisina</i>	-	-	OH	-	OH	<i>Populus</i>
Genkwanina	H	OH	OH		OME	<i>Diosma</i>
<i>Luteolina</i>	OH	OH	OH	-	OH	<i>Reseda</i>
<i>Pinocembrina</i>	H	H	OH	H	OH	<i>Populus</i>
<i>Tectochrisina</i>	H	H	OH		OMe	<i>Populus</i>
<i>Luteolina 7- Metil éter</i>	OH	OH	OH	H	OME	<i>Robinia</i>



Cuadro 2. Flavonoles asociados a la actividad apícola

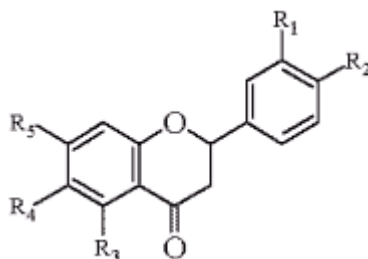
Nombre vernáculo	R1	R2	R3	R4	R5	R6	Fuente
Galangina	-	-	OH	-	OH	-	<i>Alpinia</i>
Fisetina	OH	OH	-	-	OH	-	<i>Rhus</i>
Kaemferol	-	OH	OH	-	OH	-	<i>Delphinium</i>
Herbacetina	-	OH	OH	-	OH	OH	<i>Gossypium</i>
Quercetina	OH	OH	OH	-	OH	-	<i>Quercus</i>
Ramnetina	OH	OH	OH	-	OMe	-	<i>Rhamnus</i>
Quercetagetina	OH	OH	OH	OH	OH	-	<i>Tagetes</i>
Gossipetina	OMe	OH	OH	-	OH	OH	<i>Gossypium</i>
Isorramnetina	OH	OMe	OH	-	OH	-	<i>Cheiranthus</i>



Cuadro 3. Antocianidinas asociadas a la actividad apícola

Nombre vernáculo	R1	R2	R3	R4	R5	R6	Fuente
Apigenidina	-	OH	OH	-	OH	-	<i>Reichsteineria</i>
Luteolinidina	OH	OH	OH	-	OH	-	<i>Reichsteineria</i>
Pelargonidina	-	OH	OH	OH	OH	-	<i>Pelargonium</i>
Cianidina	OH	OH	OH	OH	OH	-	<i>Centaurea</i>

Peonidina	OMe	OH	OH	OH	OH	-	<i>Paeonia</i>
Delfinidina	OH	OH	OH	OH	OH	OH	<i>Delphinium</i>
Petunidina	OMe	OH	OH	OH	OH	OH	<i>Petunia</i>
Malvidina	OMe	OH	OMe	OH	OH	OMe	<i>Malva</i>



Cuadro 4. Flavanonas asociadas a la actividad apícola

Nombre vernáculo	R1	R2	R3	R4	R5	Fuente
Pinocembrina	-	-	OH	-	OH	<i>Pinus</i>
Liquiritigenina	-	OH	-	-	OH	<i>Glycyrrhiza</i>
Naringenina	-	OH	OH	-	OH	<i>Prunus</i>
Sakuranetina	-	OH	OH	-	OMe	<i>Prunus</i>
Eriodictiol	OH	OH	OH	-	OH	<i>Eriodictyon</i>
Hesperetina	OH	OMe	OH	-	OH	<i>Prunus</i>

Muchos apicultores creen, que *A. mellifera* recoge solamente las resinas de los árboles que se encuentran en el entorno de la colmena, olvidando la amplitud de su capacidad vuelo, que les permite efectuar la selección de aquellas resinas que necesite específicamente. Cada región presenta condiciones de flora diversa, dependiente de fenómenos locales, influenciados por la temperatura, las precipitaciones y la evapotranspiración. En este sentido es indispensable considerar la similitud en algunos componentes básicos de algunos vegetales, cuyas

características particulares vendrán dadas por las diversas combinaciones de los elementos que las constituyen. Esto se comprenderá mejor al analizar la relación entre la composición química de los propóleos y sus propiedades medicinales.

La flora apícolas asociada a los flavonoides corresponde a especies tales como *Robinia pseudoacacia* (Fabaceae); *Anthemis nobilis* (Asteraceae) *Cereus grandiflorus*, (Cactaceae), *Caléndula officinalis* (Asteraceae), *Crataegus* sp. (Rosaceae), *Tussilago farfara* (Asteraceae), *Matricaria chamomilla* (Asteraceae), *Primula* sp. (Primulaceae) *Prunus spinosa* (Rosaceae), *Sambucus niger* (Caprifoliaceae, en Colombia esta planta se usa en la medicina tradicional como agente expectorante. *Filipendula ulmaria* (Rosaceae) *Helichrysum arenarium* (Asteraceae), *Tilia* sp. (Tiliaceae), *Betula* sp. (Betulaceae), *Juglans regia* (Juglandaceae), *Juglans cinerea* (nogal), *Potentilla anserina* (Rosaceae), *Eucalyptus* sp (Myrtaceae), *Citrus aurantium* (Rutaceae), *Citrus limon* (Rutaceae), *Citrus medica* (Rutaceae), *Spilanthes oppositifolia* (Asteraceae), *Curatella americana* (Dilleniaceae). *Dioscorea trifida* (Dioscoreaceae), *Cavendishia bracteata* (Ericaceae) *Gaylussacia buxifolia* de la (Ericaceae), *Croton glabellus* (Euphorbiaceae), *Hura crepitans* (Euphorbiaceae). En la práctica se debe señalar, el hecho de que en época de grandes flujos de néctar, en las que se manipulan más gránulos de polen, las abejas recolectan menos resinas, bálsamos y propóleo, mientras que en condiciones de bajo flujo de néctar, *Apis mellifera* se preocupa por coleccionar más resinas, de otra parte y en relación a la alimentación de las abejas, reducen prácticamente la búsqueda de materiales para la elaboración de propóleos. (Salamanca et al. 2002).

5. Estudios terapéuticos realizados sobre propóleo

Philippe (2002) cita en su obra “Guía del apicultor” los siguientes estudios:

“Según los estudios de Feuereisi y Kraus (1958), ciertas fracciones del propóleo contienen una sustancia capaz de inhibir in vitro el crecimiento de *Bacillus tuberculosis*, y Lavie (1968) ha mostrado que el extracto del propóleo tiene efectos bacteriostáticos sobre al menos 30 cepas microbianas. Ensayado sobre 12 microorganismos, el propóleo se ha mostrado tan eficaz como 16 unidades de penicilina y como 25 de fungicidina (Véchet, 1973). De acuerdo con los estudios de Grecianu y Enciu (1976), extractos de propóleo obtenidos tratando éste con agua a 80 °C, alcohol etílico a 96° o con 2% de etilen-diamina, inhiben el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus str. Oxford*, *Streptococcus equi*, *Salmonella sp. A y B*, *Proteus rettgeri*, *Bacillus anthracis . B. cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Erysipelothrix insidiosa*, *Corynebacterium equi*, *Pasteurella multocida* y *Clostridium perfringes*. La actividad bacteriostática del extracto del propóleo se manifiesta máxima en pH comprendido entre 6 y 6.9. Estos extractos (5 mg/ml) se mostraron más eficaces contra 11 de estas bacterias que 0,04 U.I. de penicilina por mililitro, pero no inhibieron el crecimiento de *Echerichia coli* ni el de *Clostridium tetani*. Según Aspy (1977), el propóleo inhibe el desarrollo de numerosas bacterias Gram-positivas. Entre otras, en triptosa que contenía 0.5 mg de propóleo por mililitro, *Streptococcus viridans* y *S. agalactiae* son inhibidas completamente. Józwik y Baraniecka Wloszizcka (1976) han mostrado que el crecimiento de varias cepas de *Mycobacterium* patógenos (*M. tuberculosis var. Hominis, bobis y avium*), así como varias especies de *Mycobacterium* saprofitos era inhibido por extractos alcohólicos

de propóleos. Se ha señalado también la acción biostática de éstos sobre *Aspergillus flavus*, *A. ochraceus*, *A. sulphureus*, *Penicillium viridicatum* y *P. notatum*.

Shub *et al.* (1978) estudiaron la acción antimicrobiana de extractos en etanol de muestras de propóleos de 18 regiones diferentes de la ex-URSS , y mostraron que esta acción varía con el origen del propóleo. Diluidos desde 60 mg/l hasta 1 g/l en el agar de placas petri , estos extractos inhibieron el desarrollo de *Bacillus cereus* y *Staphylococcus aureus* , a una concentración de 125 a 500 mg/l según el origen del propóleo. El de Odessa se manifestó más activo que los demás.

Karimonova (1960). Ha mostrado la eficacia del propóleo contra la tuberculosis de pulmón, la amigdalitis, el virus de la gripe, así como en la curación de quemaduras. Experimentalmente Shevchenko *et al.* (1972) ha mostrado que una solución alcohólica de propóleo al 5%, administrada con aerosol por vía nasal dos horas antes de la infección, inhibía completamente el virus de la gripe en los ratones.

Tratando la faringitis subatrópica y atrópica crónicas en 260 pacientes por medio de una solución al 15 % de extracto de propóleos, Kravchuk (1971) obtuvo 67.6 % de curaciones completas, 28.2 % de mejoras y sólo 4.2% de efecto nulo.

La aplicación de un extracto etanólico de propóleos sobre heridas en perros mostró una regeneración en tejidos óseos dos veces más rápida que la regeneración sin intervención. (Stojko, 1978).

Sucky (1977), por medio de un test, puso de relieve la eficacia del propóleo en el tratamiento de la tricomoniasis de la vagina y del cuello del útero; in vitro,

tricomonas vaginalis desaparece en 24 horas a concentraciones de 3 a 9 mg de propóleos por mililitro.

Según Dimitrescu, citado por Chauvin (1980), el asma bronquial llegaría a mejorarse netamente, si no a curarse, por la administración de propóleos por vía interna.

El propio Chauvin ha comprobado el efecto curativo de estos sobre algunas fiebres del heno rebeldes a los medicamentos normales. La administración por vía interna de 7 u 8 dosis diarias durante 8 días harían desaparecer el asma durante dos años. Una dosis equivalente de 250 mg de extracto total seco.”

6. Acción y actividad biológica del propóleo:

A pesar de que la temperatura de la colmena es de 34-35 °C, extremadamente favorable para la reproducción de microorganismos, el propóleo permite que permanezca estéril.

La mayoría de los microorganismos no se vuelven resistentes a él.

Puede ser tanto inmunoestimulante como inmunodepresor; estos aspectos de la acción del propóleo son importantes en el tratamiento de las lesiones orgánicas del sistema nervioso central como meningitis, encefalitis, traumatismos cerebrales y sus secuelas.

a. Acciones del propóleo: - Acción antibacteriana y bacteriostática. - Acción anestésica. - Acción cicatrizante, - Acción antiinflamatoria. - Acción positiva sobre los mecanismos inmunológicos. - Acción antifúngica.

b. Actividad biológica del propóleo

- Contiene gammaglobulinas.
- Inhibe la aglutinación de trombocitos y por ende, la coagulación de la sangre a una concentración de 0.1 mg./ml.
- Es capaz de elevar la actividad complementaria del plasma sanguíneo.
- Tiene efecto inhibitor sobre la aglutinación de plaquetas.
- Aumenta la formación de anticuerpos.
- Tiene extraordinarias propiedades antioxidantes.
- Es inmunoestimulador no específico, estimula los factores específicos y no específicos de la inmunidad.
- Eleva la actividad de los antibióticos.
- Aumenta la fagocitosis.
- Incrementa el contenido de properdina (proteína particular del suero hemático, que en unión del complemento y en presencia de sales de magnesio posee poder bactericida) en la sangre.
- Por vía oral o interna, refuerza el metabolismo y eleva la resistencia del organismo a la acción de los factores desfavorables del medio.
- Combate las fibrinas (cáncer) por la acción de las amilasas, lipasas y tripsina.
- Es 3.5 veces más potente como anestésico que la cocaína.
- Ejerce acción antiulcerosa.

-Es antiinflamatorio.

-Tiene efecto fitoinhibidor y antimicótico.

-Posee acción antibacteriana de amplio espectro

-Su acción antiviral incluye herpes virus, poliovirus, los virus A y B de la gripe de Aujeszky, la Sota, de la vacuna, de la enfermedad de Newcastle y otros.

-Regenera los tejidos (es el mejor cicatrizante existente, superior a la sábila, la furazolidona, el yodo-polivinil-pirrolidona, el óxido rojo de mercurio-ácido bórico, el cloramfenicol y la bacitracina-neomicina-polimixina).

7. Propiedades antimicrobianas

El secreto del uso del propóleo en medicina humana y veterinaria, en la protección de injertos y colmenas, y en la preparación de productos farmacéuticos, radica en sus propiedades antimicrobianas, bacteriostáticas y bactericidas, proporcionadas por los ácidos benzoico, oxibenzoico, metoxibenzoico, cafeico, ferúlico, los sesquiterpenos y las flavononas (principalmente la galangina).

Las propiedades del propóleo pueden ser atribuidas fundamentalmente, a los flavonoides pinocembrina, galangina, pinobanksina, pinobanksina-3-acetato, éster bencil del ácido p-cumárico y mezclas de ésteres del ácido caféico. El ácido caféico es uno de los compuestos que intervienen en la actividad del propóleo contra

Staphylococcus aureus, *Proteus vulgaris*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Helminthosporium* sp.

La actividad antibacteriana del propóleo es mucho más notable sobre las bacterias grampositivas que sobre las gramnegativas. Por tanto con bacterias grampositivas como gramnegativas, el propóleo tiene una acción superior que los antibióticos cloramfenicol, eritromicina, estreptomicina, penicilina, ceforán, tetracilina, kanamicina, ampicilina y los antisépticos cetavión a 1% tintura de timerosal a 0.1% cloruro de benzalconio a 1:1000 e hibitane a 1:1000. En estudios in vitro. (Asís, 1996).

Las investigaciones clínicas y de laboratorio corroboran la acción antimicrobiana y antimicótica de los preparados. Las soluciones inyectables presentan in vitro una buena acción antifúngica. El extracto líquido da buenos resultados en las aftas bucales. Los ungüentos experimentados clínicamente en numerosas afecciones cutáneas han establecido resultados apreciables en pruritos localizados y neurodermatitis. (Asís, 1996).

8. Comparación de la acción de propóleos de abejas nativas ecuatorianas (trigonas meliponas) con los de *Apis mellifera* (abeja productiva introducida).

Chieruzzi, citado por Redín (1991), indica que las regiones tropicales y subtropicales de América se han visto desfavorecidas de investigaciones relacionadas con el propóleo. En adición a las abejas europeas (*Apis mellifera*) introducidas para la producción de miel. El Ecuador cuenta con poblaciones indígenas de abejas sin aguijón (Meliponini) el cerumen (mezcla de de propóleo y cera) de una de estas abejas, “miel de tierra” (Género Geotrigona), están atribuidas propiedades antimicrobiales en la medicina tradicional de la costa ecuatoriana.

Según Redín (1991), Se destacan diferencias entre los propóleos provenientes de diferentes especies y géneros de abejas tanto en sus efectos microbianos como en su composición, y lugar de procedencia.

Se ha observado que los extractos de propóleo de abejas melíferas tienen mayor efecto inhibitor que el propóleo de las abejas trigonas (abejas sin aguijón, llamadas-al igual que las meliponas- "abejas de la tierra").

9. Actividad antiviral

La capacidad de los extractos de propóleo de contener el desarrollo de formas patógenas de virus, ha sido demostrada.. (Asís, 1996).

Los flavonoides revelan una actividad antiviral bien definida, en particular la apigenina, acacetina y pectolinarigenina que están presentes en las yemas del álamo y del abedul. (Asís, 1996).

El propóleo inactiva los virus de Aujeszky y la cepa vacunal La Sota, pero no al de la encefalomiocarditis; además, el propóleo es inocuo para los animales de laboratorio y los embriones de pollo. (Asís, 1996).

10. El propóleo en la apiterapia

La Apiterapia es la utilización adecuada de todos los derivados de las abejas en el campo de la medicina natural apibioenergética. Comprende el empleo de la cera, la miel, el polen, el propóleo e inclusive el veneno de las abejas en el tratamiento y prevención de las enfermedades que se presentan en el organismo humano.

Los científicos del mundo entero han descubierto que los productos de la abeja tienen más de 100 efectos farmacológicamente útiles. El solo propóleo tiene más de 60 efectos farmacológicamente demostrados.

Los productos apícolas tienen una gran importancia en la nutrición y salud de los niños. En el antiguo Egipto se daba miel a los alumnos en las escuelas. En la antigua Grecia, Sorano de Efeso recomendó la miel para los niños recién nacidos,

teniendo en cuenta que la miel abre el apetito y es beneficiosa para el organismo. En las escuelas de Japón, se da gratuitamente miel y jalea real a los niños.

11. Listado de aplicaciones en medicina humana.

ANGIOLOGIA	CARDIOLOGIA Y ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES
CAUMATOLOGIA	CIRUGIA
DERMATOLOGIA	ENDOCRINOLOGIA Y ENFERMEDADES METABOLICAS
ENFERMEDADES INFECCIOSAS	ENFERMEDADES RESPIRATORIAS
ESTOMATOLOGIA	GASTROENTEROLOGIA
GINECOLOGIA Y OBSTETRICIA	HEMATOLOGIA E INMUNOLOGIA
NEFROLOGIA Y UROLOGIA	NEUROLOGIA
OFTALMOLOGIA	ONCOLOGIA Y RADIOLOGIA
OTORRINOLARINGOLOGIA	PEDIATRIA
PROCTOLOGIA	PSIQUIATRIA
REUMATOLOGIA	

12. Alergia al Propóleo.

Un pequeño porcentaje de la población es alérgica al propóleo y a los demás productos apícolas (polen, jalea real, miel, veneno). Teniendo esto en consideración

es necesario aplicarles a los pacientes pruebas de alergia provocada antes de comenzar cualquier tratamiento con propóleo. Las reacciones alérgicas al propóleo surgen, por lo general, en personas que son alérgicas a las abejas, o a sus picaduras, así como en personas que padecen de algún tipo de problema alérgico sobre todo en la terapia de afecciones del aparato respiratorio y de cavidad oral, pero su campo de aplicación es más extenso. La dermatología, la medicina interna y hasta la cosmética se han beneficiado de las propiedades regeneradoras y cicatrizantes de la sustancia más original que recolectan las abejas. Si se mastica de vez en cuando un pedazo de propóleo, se fresca el aliento y se favorece la higiene de la cavidad oral. Fuera del campo médico el propóleo tiene otros usos. En apicultura se puede emplear para barnizar las cajas, y gracias a sus propiedades impermeabilizantes los resultados son muy buenos. Se puede disolver en alcohol u otros disolventes para grasas, y se puede usar también mezclado con aceite de linaza cocido.

13. Curiosidades históricas del propóleo

Por último, citaremos dos curiosidades históricas sobre este producto de la colmena. La primera de ellas se refiere al antiguo Egipto, donde el propóleo formaba parte de los productos embalsamadores, junto con otras sustancias de la colmena. La segunda se refiere a su uso para tratar la madera de los instrumentos musicales, fabricados por los famosos liutai italianos de los siglos XVII y XVIII. Para la mayoría sigue siendo un secreto el tipo de barniz que usaban artesanos como Stradivari y otros. Hay quien dice que las propiedades del propóleo tienen algo que ver con la prodigiosa sonoridad de sus instrumentos musicales.

B. ESTAFILOCOCOS

1. Clasificación de los estafilococos

De acuerdo con la producción de pigmentos:

Staphylococcus aureus (dorado)

Staphylococcus citreus (amarillo limón)

Staphylococcus albus (blanco)

De acuerdo con la prueba de la cuagulasa:

Staphylococcus aureus, que es cuagulasa positiva y patógena

Staphylococcus epidermidis, que es cuagulasa negativa y no patógena

En época mas reciente, se han encontrado estafilococos cuagulasa negativos como agentes patógenos en infecciones urinarias, y a veces a pacientes sometidos a cirugía cardiaca, estas bacterias siguen siendo patógenos y conservan su fosfatasa y desoxirribonucleasa, enzimas que no se encuentran en las cepas no patógenas.

2. Propiedades de los estafilococos

- Cocos grampositivos dispuestos en racimos (aspecto de uvas)
- Aerobios

- El estafilococo patógeno produce exotoxinas
- Su acción sobre la lactosa es no significativa
- Su producción de indol es no significativa
- Carecen de cápsula
- No son móviles
- Carecen de esporas

C. *Staphylococcus aureus*

1. Patología

Los estafilococos pueden producir muchas infecciones cutáneas (diversos, flemones y forúnculos) y también pueden infectar las heridas. No son raras osteomielitis y los abscesos del seno por estafilococos.

El estafilococo patógeno produce numerosas exotoxinas, y entre ellas algunas variedades de hemolisinas, una dermatonecrosina, una leucocidina, y una enterotoxina.

La enterotoxina previamente señalada es causa común de intoxicación alimenticia. A diferencia de otras exotoxinas, la enterotoxina del estafilococo resiste al calor y probablemente no se llega a destruir con el cocimiento.

Es común la presencia de enterotoxinas en productos lácteos en los cuales fueron introducidos estafilococos de las manos, piel o vías nasales de las personas que manejaron dichos productos.

La enterotoxina del estafilococo produce una enfermedad breve, de 12 a 24 horas, con diarrea y vómitos.

Staphylococcus aureus también es capaz de producir una gran variedad de enfermedades, tales como neumonía, endocarditis, meningitis, impétigo. El impétigo por estafilococos se da con bastante frecuencia en los recién nacidos y causa una considerable preocupación en la sala de los recién nacidos.

La enterocolitis estafilocócica es un proceso agudo y fulminante, cuando por razones desconocidas *Staphylococcus aureus* coloniza la mucosa intestinal y el contenido del intestino.

Staphylococcus aureus Produce una enzima que hace inactivos a la mayoría de los tratamientos basados en penicilina, dando como resultado la ineficacia de estos antibióticos. Jones, *et al.* (1998).

La mastitis es una inflamación de la glándula mamaria, puede aparecer como mastitis subclínica, es decir sin síntomas apreciables, o bien como mastitis clínica, con signos evidentes de la enfermedad.

2. Mastitis causada por *Staphylococcus aureus*

Las mastitis causadas por *Staphylococcus aureus* son extremadamente difíciles de controlar por el tratamiento solamente, estos colonizan extremos del pezón o lesiones anormales del pezón. Sus toxinas destruyen las membranas de las células y pueden dañar directamente la leche producida en el tejido fino, la formación de cicatrices y abscesos dan muestra de una respuesta pobre al tratamiento antibiótico. Las células alveolares y de los conductos, pueden ser destruidas, reduciendo así la producción de leche (Jones, *et al*,1998).

La situación se torna mas crítica en el caso de *Staphylococcus aureus*, que en recientes investigaciones demostró resistencia a mas de 200 antibióticos. (Jones, *et al*,1998).

La formación de una mastitis depende de diversos y numerosos factores (animal, medio ambiente y germen causal). Por este motivo se la califica de enfermedad multifactorial, el riesgo de la infección viene determinado por la relación del animal con las influencias del medio ambiente.

La mastitis de la vaca constituye una de las causas más importantes de la falta de rentabilidad de una explotación. Amplios estudios realizados en los países productores de leche, han mostrado que un 50 % de todas las vacas padecen mastitis, que, principalmente son de tipo subclínico (Deneke *et al*, 1993). Cuidadosos análisis indican que el 80 % de las pérdidas de la producción de leche son debidas a las mastitis subclínicas.

Esta estimación procede del hecho de que el cuarterón enfermo presenta una producción de leche que es un 20 % menor que la del cuarterón paralelo sano.

Además a este problema hay que añadir, las pérdidas de las ventas por baja calidad de la leche. La alteración en la calidad de la leche se debe principalmente en una variación en su composición. Así por ejemplo, el contenido de caseína, calcio y fósforo disminuye, mientras que aumenta el contenido de albúmina, cloro y sodio. Estas modificaciones se encuentran tanto en la secreción láctea alterada de un determinado animal como en la leche de las vacas con frecuentes mastitis subclínicas.

Para las industrias lácteas estas alteraciones en la composición de la leche natural, Significa una gran dificultad de la preparación de la leche para el consumo así como una Modificación del gusto y de la estabilidad. (Deneke *et al*, 1993).

Las modificaciones cualitativas de la leche producidas por la mastitis se traducen en un mayor contenido celular. La leche con alto contenido en células sufre un descuento en su valoración, por lo que, para los ganaderos, las mastitis se traducen en la práctica en un menor beneficio en las ventas y también debido a:

- La alteración o incluso la pérdida total, pasajera o permanente, de la secreción láctea.

- La imposibilidad de distribución de la leche durante la enfermedad y el tiempo. de la eliminación del medicamento tras el tratamiento. Los costos del tratamiento, técnico, exámenes de laboratorio, medicamentos etc.

- La menor productividad al tener que prescindir de animales por falta de curación y bajo rendimiento.

- La sobrecarga de trabajo por los mayores cuidados que los animales requieren.

D. QUIMIOTERÁPIA Y ANTIBIÓTICOTERAPIA

La quimioterapia, es decir, la destrucción de los microorganismos por medio de fármacos, se inició con los estudios pioneros de Ehrlich, que culminaron con la obtención del salvarsán para el tratamiento de la sífilis. En 1935 fueron introducidas las sulfamidas, después del trabajo de Domagk sobre el uso del Prontosil, cuyo fundamento activo es la sulfanilamida, en el tratamiento de las infecciones estreptocócicas en ratones. Desde entonces se han sintetizado docenas de nuevas sulfamidas con actividad antibacteriana cada vez mayor y con una menor toxicidad. (Álvarez *et al*, 2001).

El término “antibióticos” se refiere a sustancias elaboradas por organismos vivos que tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de microorganismos. Es bien

conocida la historia del descubrimiento de la penicilina por Fleming, en 1929, su aplicación al tratamiento de la enfermedad humana y el desarrollo subsiguiente de diversos antibióticos nuevos. Actualmente no hay una diferencia neta entre los términos “antibióticos” y “agentes quimioterápicos”, pues algunos de los antibióticos que inicialmente se aislaron a partir de fuentes naturales se han preparado sintéticamente, como es el caso del cloramfenicol. (Matteh, 1992).

1. **Modo de acción de los antibióticos**

Se ha visto que los antibióticos actúan de distintas maneras:

- Modifican la pared celular y permiten que el contenido en las bacterias escape, o se diluya en forma irreversible por ósmosis – penicilina, bacitracina y vancomicina.
- Modifican la membrana celular, dentro de la pared, y paralizan los mecanismos de intercambio – polimixina, colistina, nistatina, anfotericina B, estreptomina, y kanamicina.
- Alteran la síntesis de proteínas – cloramfenicol, tetraciclina, y macrolidos (eritromicina, oleandomicina, espiromicina y otros).
- Inhiben el metabolismo de ácidos nucleicos – griseofulvina.
- Bloquean el metabolismo intermedio – sulfonamidas.

Los antibióticos pueden matar los microorganismos, en cuyo caso se habla de una concentración bactericida, o simplemente impedir su desarrollo, tratándose entonces de una concentración bacteriostática. En terapéutica basta con la bacteriostasis; permiten que las demás defensas tisulares curen definitivamente la enfermedad.

2. Antibiogramas

Son técnicas mediante las cuales se estudia la sensibilidad del germen productor de una infección a los antimicrobianos. Estas técnicas están perfectamente estandarizadas que permiten, *in vitro*, definir claramente los conceptos de sensibilidad y resistencia, relacionándolos con lo que ocurre *in vivo*. (Álvarez *et al*, 2001).

a. Sensibilidad

Un microorganismo se considera sensible a un determinado antibiótico cuando este puede alcanzar niveles plasmáticos iguales por lo menos a la concentración mínima inhibitoria (CMI) en el lugar de la infección. Se considera como CMI, la mínima cantidad de antimicrobiano capaz de inhibir el crecimiento de un microorganismo.

b. Resistencia

Un microorganismo se considera resistente a un antibiótico cuando la concentración máxima de antimicrobiano que se puede conseguir en el lugar de la infección (líquidos, tejidos o suero) no es suficiente para afectarle, o, dicho de otra forma, que la concentración de la droga en aquel punto es inferior a la CMI necesaria para eliminar el germen, y que por efectos secundarios tóxicos es imposible elevar la dosis. (Davidsohn,1998).

3. Resistencia a los antibióticos

La tendencia de muchas bacterias a hacerse resistentes a los antibióticos ha venido a constituir un problema cada vez de mayor importancia especialmente en cuanto a los estafilococos y a los bacilos tuberculosos. Estas cepas resistentes han causado un número alarmante de infecciones serias dentro y fuera de los hospitales. Esto parece indicar que el uso inadecuado que el uso inadecuado de los antibióticos puede conducir a graves consecuencias, de aquí la importancia de realizar pruebas de susceptibilidad. La resistencia puede deberse a distintos mecanismos:

- Producción de una sustancia que destruye el antibiótico (penicilinas para la penicilina).
- Adaptación de metabolismo bacteriano a la falta del sistema enzimático particular que resulta inhibido por el antibiótico.
- La pared celular se vuelve impermeable al antibiótico.

- Algún fago comunica una resistencia a los antibióticos, mediante un fenómeno de transducción.
- La desaparición de cepas sensibles por efecto de un antibiótico desenmascara un número aparentemente mayor de cepas resistentes cuya supervivencia representa un fenómeno de selección natural.
- Se producen cepas mutantes.
- Hay transferencia no cromosómica de resistencia al fármaco originada en otras bacterias. (Davidsohn, 1998).

III MATERIALES Y MÉTODOS

C. MATERIALES

3. Materiales de campo

- Guantes quirúrgicos
- Mascarilla
- CMT (prueba de mastitis California con su bandeja de cuatro posillos)
- Alcohol antiséptico
- Franelas
- Tubos de ensayo
- Hielo
- Jeringas
- Toallas de papel desechables.
- Trampas de propóleo
- Traje de protección apícola.
- Fundas de polietileno negras

2. Materiales de laboratorio

a. OBTENCIÓN DE MUESTRAS Y ANÁLISIS EN LABORATORIO

- Alcohol 70-80 %.

- Medios de cultivo (Agar sangre, Agar nutritivo, Mueller – Hinton, Agar sal manitol.).
- Agua oxigenada.
- Suero fisiológico.
- Cloruro de bario 1% químicamente puro.
- Ácido sulfúrico 100% químicamente puro.
- Discos de antibiograma.
- Discos de Ciprofloxacina para antibiograma.
- Hisopos largos de madera.
- Plástico sellador de cajas de petri.
- Tanque de gas doméstico.
- Mechero a gas.
- Fósforos.
- Cámara de flujo.
- Placa de vidrio para secar discos impregnados con diluciones de propóleo.
- Palillos mondadientes.
- Cobre y portaobjetos.
- Pinzas de laboratorio clínico.
- Tubos de ensayo de 10 ml.
- Tubos ensayo citratados.
- Sangre del grupo O positivo.
- Centrífuga.
- Plásmas sanguíneos citratados.
- Colonias de *Staphylococcus aureus*.
- Refrigeradora.

- Escala nefelométrica de Mc Farland.
- Extractos de propóleo 100, 50, 25 %
- Portatubos.
- Etiquetas.
- Tubos de ensayo.
- Cajas petri.
- Incubadora de laboratorio clínico.
- Microscopio Olympus para diagnóstico clínico.
- Cámara de flujo.
- Mascarillas.
- Guantes quirúrgicos.
- Mandil.
- Asas de platino.
- Papel aluminio.
- Jeringas de 1ml, 5ml.
- Marcadores permanentes.

**b. ELABORACIÓN DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE
PROPÓLEO**

- Masa de propóleo.
- Alcohol Etílico de 96° para uso interno sin antiséptico.
- Congelador
- Mortero

- Frasco de cristal oscuro hermético
- Filtro
- Autoclave
- Etiquetas
- Malla plástica

D. MÉTODOS

4. Factores en estudio

- Diluciones del extracto puro.

Propóleo	P1: 100 %
	P2: 50 %
	P3: 25 %
	P4: 0 %
	P5: antibiótico comercial (Ciprofloxacina)

- Diluciones del agente bacteriano.

Staphylococcus aureus

Nomenclatura	Escala de Mc Farland	Equivalencia en U.F.C.
D1	0.5	1.5×10^8
D2	5	15×10^8

D3

9

 27×10^8

U.F.C.= Unidades Formadoras de Colonias

5. Tratamientos

De la combinación de los dos factores en estudio se tienen los siguientes tratamientos:

Cuadro 5. Tratamientos y combinación de los dos factores en estudio

Nº Tratamiento	Nomenclatura	Descripción
T1	P1D1	Propóleo 100%, U.F.C. al 0.5 de Mc Farland
T2	P1D2	Propóleo 100%, U.F.C. al 5 de Mc Farland
T3	P1D3	Propóleo 100%, U.F.C. al 9 de Mc Farland
T4	P2D1	Propóleo 50%, U.F.C. al 0.5 de Mc Farland
T5	P2D2	Propóleo 50%, U.F.C. al 5 de Mc Farland
T6	P2D3	Propóleo 50%, U.F.C. al 9 de Mc Farland
T7	P3D1	Propóleo 25%, U.F.C. al 0.5 de Mc Farland
T8	P3D2	Propóleo 25%, U.F.C. al 5 de Mc Farland
T9	P3D3	Propóleo 25%, U.F.C. al 9 de Mc Farland
T10	P4D1	Propóleo 0%, U.F.C. al 0.5 de Mc Farland
T11	P4D2	Propóleo 0%, U.F.C. al 5 de Mc Farland
T12	P4D3	Propóleo 0%, U.F.C. al 9 de Mc Farland
T13	P5D1	Antibiótico comercial, U.F.C. al 0.5 de Mc Farland

T14	P5D2	Antibiótico comercial, U.F.C. al 5 de Mc Farland
T15	P5D3	Antibiótico comercial, U.F.C. al 9 de Mc Farland

3. Procedimiento

a. Diseño experimental

El diseño a emplearse será completamente al azar simple en arreglo factorial 5X3.

Cada caja petri contendrá tres discos de propóleo, uno de etanol y uno de un antibiótico comercial, siendo cada caja petri una unidad experimental.

b. Número de repeticiones

Se realizarán tres repeticiones por cada tratamiento

c. Esquema del análisis de variancia

Cuadro 6. Esquema del análisis de variancia

Fuentes de variación	Grados de libertad
TOTAL	44
TRATAMIENTOS	(14)
P	4
D	2
PXD	8
ERROR	30

- Pruebas de Duncan al 5% para diluciones de propóleo (P), para diluciones de bacterias (D) e interacción PxD.
- Regresión y correlación entre las diluciones de propóleo y las diluciones de bacterias con las diferentes variables en estudio.

d. Variables a tomarse y métodos de evaluación

La variable a tomar es el radio del halo de inhibición la cual deberá variar en función de la concentración bacteriana y diluciones del extracto puro de propóleo, en comparación con el testigo con antibiótico y la dosis recomendada. La cual fue tomada en milímetros.

e. Métodos específicos del manejo del experimento

Fase 1: aislamiento e identificación de *Staphylococcus aureus* a partir de secreciones lácteas de vacas enfermas con mastitis.

Como primera medida se procedió a realizar una inspección y palpación de la ubre para determinar algún tipo de alteración, de esta manera se reveló engrosamientos o estrechamientos de algunos de los cuarterones, alteraciones de la piel, pezón y lesiones traumáticas.

Con la palpación de la ubre y, sobre todo del pezón, se aprecian endurecimientos y zonas dolorosas. En la zona de transición de la cisterna mamaria al canal del pezón, se pueden apreciar estrechamientos (aumento del grosor del epitelio) que originan trastornos en la emisión de leche.

Cuando hubo una inflamación aguda, el cuarterón correspondiente, aparece aumentado de tamaño, es doloroso y muestra enrojecimiento con elevación de temperatura (a partir de 39 °C).

Identificando a las vacas con las características anteriormente descritas se procedió a realizar el test de glóbulos blancos en la hacienda “Camilita” en el barrio Patichubamba de la parroquia Pintag del cantón Quito.

El test de glóbulos blancos es un procedimiento de inspección químico-físico; la leche con elevado contenido de glóbulos blancos debido a la infección experimenta un cambio visible.

1) Fases del proceso de control de glóbulos blancos

- Antes del ordeño, se introdujo los primeros chorros de cada uno de los cuarterones en los correspondientes pocillos de la bandeja del test (se las llenó hasta la mitad).

- Mediante inclinación de la bandeja del test, decantar la leche sobrante de los pocillos dejando un resto de unos 2 ml. Durante la decantación no debe entrar leche en ningún otro pocillo.

- Se añadió una cantidad del líquido del test iguala 1-1.5 veces la cantidad de leche, sin formar espuma

- Con un lento movimiento circular de la bandeja del test en posición horizontal, se mezcló a fondo el contenido de los pocillos. La reacción se produce al cabo de unos pocos segundos durante este movimiento circular. Las modificaciones que se producen informaron sobre el estado de las ubres.

Después de cada control, se desecho el contenido de los pocillos, se lavó la bandeja y pocillos y se los volvió a utilizar en los demás animales.

2) Valoración del test de glóbulos blancos en la leche.

Reacción negativa (-)

La mezcla de la leche con el líquido del test conserva su fluidez y no muestra alteraciones visibles. Contenido normal (hasta 500 000 glóbulos / ml.

Reacción ligeramente positiva (+)

La mezcla se vuelve estriosa. El contenido de glóbulos blancos ha aumentado ligeramente (400 000 hasta 1.5 millones de glóbulos / ml.). La producción lechera disminuye.

Reacción positiva (++)

Mezcla bastante musilaginosa (movimiento más lento de la mezcla). El contenido de glóbulos ha aumentado (800 000 hasta 5 millones de glóbulos / ml.). La producción de leche disminuye de forma considerable.

Reacción fuertemente positiva (+++)

La mezcla aparece muy musilaginosa y gelatinosa, no fluye libremente y se forman grumos. El contenido de glóbulos se ha incrementado de forma ostensible (casi siempre por encima de 5 millones de glóbulos / ml.). La producción de leche disminuye de modo importante.

Una vez identificados los cuarterones afectados con mastitis, se procedió a tomar muestras de la leche de los mismos.

3) Extracción correcta de muestras de leche

Las normas que se siguieron en la recolección de muestras de leche fueron las siguientes:

- Se tomo muchas medidas de asepsia para no contaminar las muestras, se usaron guantes y mascarilla estériles.

- Se lavó la ubre con abundante agua.
- Se desinfectó el pezón con una solución de alcohol 70 – 80 %, y con toallas de papel desechables se procedió a secarlo.
- Se desechó el primer chorro de leche
- En tubos estériles con tapa hermética se llenó a los 2/3 de su capacidad, abriendo solamente lo necesario y tapándoles inmediatamente.
- Se evitó no tocar el tapón inferior ni tampoco el borde del tubo con el fin de evitar posibles contaminaciones.
- Inmediatamente después de la extracción, se refrigeró las muestras.

4) Análisis de laboratorio

Inmediatamente después de la toma y refrigeración de las muestras se procedió a realizar un examen bacteriológico, que consistió en lo siguiente:

- Dentro de una cámara de flujo se destaparon las muestras se tomó 1 ml de leche del tubo y se procedió a bañar una caja pétri que contenía un medio adecuado para el crecimiento de *Staphylococcus aureus* como lo es el agar sangre.
- Se incubaron estas cajas a una temperatura óptima para su crecimiento (37 °C) durante 12 horas después de las cuales se desarrollaron varias colonias de bacterias causantes de la mastitis y la primera selección se guió por la apariencia de las colonias. Estas miden de uno a dos milímetros de diámetro después de una noche de incubación, son brillantes y con un

aspecto de “pintura de aceite” que es causado parcialmente por la producción de pigmento.

- A estas colonias se las resembró y después de 12 horas se realizó la prueba de la catalasa que distingue los estafilococos de los estreptococos.
 - a) El microorganismo se incubó por 12 horas sobre un tubo inclinado de agar nutritivo. No convienen los medios que contienen sangre.
 - b) Se vertió en el tubo, hasta cubrir las colonias, 1 ml de peróxido de hidrógeno al 3%.
 - c) La reacción positiva se tradujo por rápida efervescencia. Los estafilococos producen catalasa. Los estreptococos dan una reacción negativa. De esta manera se comprobó que nuestras colonias estaban dentro del género *Staphylococcus*.
- Posteriormente se realizó la prueba de la cuagulasa, la cual es una enzima elaborada por los estafilococos patógenos, que es capaz de coagular el plasma. Como el plasma de algunos animales no es afectado por la cuagulasa, se ha postulado que debe estar presente un factor llamado “activador”, en el plasma de aquellos animales en que la prueba es demostrable. El plasma humano y el de conejo contienen el activador y pueden ser usados para la demostración de la actividad de la cuagulasa.
- En esta prueba se diluyó al 1 por 10 plasma de sangre citratada, humana, y se colocó 0.5 ml en un pequeño tubo de ensayo estéril. Se añadió

luego 0.1 ml de caldo de 12 horas de incubación, del microbio en cuestión, y se incubó el tubo a 37°C. El plasma coagulo en seis horas determinándose que el microbio es cuagulasa positivo y demostrando de esta manera la patogenicidad de este estafilococo y enmarcándolo en el la especie *aureus*.

- Para estar completamente seguros de haber obtenido *Staphylococcus aureus* se procedió a una prueba bioquímica del agar sal manitol el cual se fermenta siendo esto una característica de microorganismos patógenos positivos a la cuagulasa la reacción se dio cambiando su color rojo a amarillo.

Una vez aislada la bacteria se procedió a preparar la escala nefelométrica de McFarland, se necesitaron 10 tubos de igual tamaño y grosor perfectamente limpios. Se dispuso también de ácido sulfúrico químicamente puro al 1 por 100 y solución de cloruro de bario al 1 por 100, también puro químicamente.

Al mezclar diferentes proporciones de ambas soluciones se consiguen distintas densidades, que están relacionadas con crecimientos bacterianos.

En la siguiente tabla se detallan las proporciones de ambos constituyentes y el recuento aproximado de bacterias:

Cuadro 7. Escala nefelométrica de Mc Farland, proporciones de sus constituyentes.

Tubo número	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Cloruro de bario al 1 por 100	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.5	0.7	0.8	0.9	1
Ácido sulfúrico al 1 por 100	9.9	9.8	9.7	9.6	9.5	9.4	9.3	9.2	9.1	9
Densidad celular $\times 10^8/\text{ml}$	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30

Fase 2: Elaboración de extractos etanólicos de propóleo.

En esta fase se recolectó propóleo de las colmenas, el cual se sometió a purificación de impurezas mecánicas para luego formar extractos etanólicos.

- Se instalaron las llamadas “trampas de propóleo”, que consiste en reemplazar la entretapa por una malla de las mismas dimensiones. Se dejó un espacio abierto entre la trampa y la tapa, de manera que las abejas sientan la necesidad de cubrir este espacio ventilado con propóleo, induciendo así su producción. Esta trampa se la mantiene durante 15 días.
- La malla impregnada de propóleo se sacó del marco, se la enrolló y congeló, para luego mediante golpes ligeros ser separado el propóleo de la malla, luego se

procedió mediante un mortero a pulverizarlo. Con este procedimiento, se obtuvo propóleos con menos impurezas.

- Obtenido el propóleo libre de impurezas se procedió a mezclar en una proporción de: 300g de propóleo, aforando este peso a 1000g con etanol de 96° de uso interno, sin antiséptico (alcohol potable).

- Posteriormente se colocó esta mezcla en vidrio, se los recubrió con papel aluminio, de esta manera se aisló la mezcla de la luz del sol.

- Durante nueve días se procedió a agitar la mezcla durante quince minutos diarios en tres intervalos de cinco minutos cada uno. Se aseguró que el sedimento que quedó pese de 30 a 33% menos del peso inicial de la masa, de esta manera se aseguró la obtención de un extracto etanólico con la mayor concentración posible.

Fase 3: En esta fase se determinó el efecto **Bactericida y Bacteriostático del propóleo en colonias de *Staphylococcus aureus*.**

- El testigo absoluto en esta fase fue el Etanol 96 ° y el testigo comercial fue la Ciprofloxacina, quinolona de amplio espectro que se caracteriza por una rápida aparición de la acción terapéutica, que demostró ser la más eficaz dentro de los antibióticos comerciales en los antibiogramas frente a colonias de *Staphylococcus aureus*.

- Se realizó una suspensión de los microorganismos en suero fisiológico al 0.5, 5, 9 de Mc Farland, colocando 0.1 ml de esta suspensión en cajas con 20 ml de Müller Hinton, y con un hisopo estéril se procedió a untar la superficie del medio en forma uniforme.

- Se impregnaron 3 discos de antibiograma para cada solución de propóleo a aplicar 25, 50, 100%, en cada caja impregnada con *Staphylococcus aureus* al 0.5, 5, 9 de Mc Farland, a todos los discos se los hizo reposar de 10 – 15 minutos, de manera que el alcohol se volatilice y así se obtenga un resultado del efecto del propóleo y no del alcohol.

Fase 4: En esta fase se determinó la concentración mínima inhibitoria CMI.

Consistió en colocar 1 ml de la suspensión de microorganismos al 1 de Mc Farland en 4 ml de Müller Hinton, en las mismas se colocaron 1 ml de varias diluciones de propóleo. La CMI se determinó observando si existe o no crecimiento del microorganismo en cada dilución.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

B. Radio del halo de inhibición

Al establecer el análisis de variancia para el radio de inhibición de los antibiogramas, se detectó diferencias estadísticas para tratamientos al nivel de 1%, al desglosar sus grados de libertad para tratamientos se encontró diferencia estadística al 1% para el factor propóleo, y dentro de este factor se diferenciaron los grupos de tratamientos que corresponden al propóleo en sus niveles y los testigos; además, se encontró diferencias estadísticas en los niveles de propóleo. Las concentraciones de bacterias no se diferenciaron estadísticamente, así como las comparaciones ortogonales correspondientes. La interacción no fue significativa por lo tanto indica que los factores en estudio de propóleo y concentraciones de bacterias actúan independientemente. (Cuadro 8.)

CUADRO 8. Análisis de variancia para el radio del halo de inhibición de los antibiogramas bajo el efecto de los niveles de propóleo y concentraciones de bacterias.

FUENTES DE VARIACION	GL	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADOS MEDIOS	F
TOTAL	44	1336.978		
TRATAMIENTOS	(14)	1316.311	94.022	136.48 **
PROPOLEO (P)	(4)	1247.644	311.911	452.77 **
ENTRE GRUPOS	2	748.681	374.341	26.72 **
DENTRO G1	2	498.963	249.481	362.09 **
CONCENTACIONES (C)	(2)	2.978	1.489	2.16 ns
C1 vs C2,C3	1	0.278	0.278	0.40 ns
C2 vs C3	1	2.700	2.700	3.92 ns
P x C	8	65.689	8.211	11.92**
ERROR	30	20.667	0.689	
\bar{X} (mm)			7.42	
CV(%)			11.18	

** Altamente significativo.

ns No significativo.

El promedio general del radio del halo de inhibición fue de 7.48 mm, con un coeficiente de variación de 12.60%, coeficiente considerado como adecuado para este tipo de investigación.

En los resultados se determinó que el radio del halo de inhibición fue mayor con el producto Ciprofloxacina alcanzando un promedio de 12.56 mm, y por lo tanto se encuentra ocupando el primer lugar del primer rango mediante la prueba de Duncan al 5%. Con etanol prácticamente no se presentó ningún halo de inhibición y por lo tanto se encuentra en el último rango. Los tratamientos con propóleo se encuentran ocupando los rangos intermedios, en donde se puede apreciar un incremento del radio del halo de inhibición a medida que este producto se encuentra más diluido.

Los radios medios de inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus* para el extracto etanólico de propóleo al 25% varían entre 10 – 13 mm. Estas dimensiones no están alejadas de las encontradas por otros autores. Brumfitt *et al.* (1990), En cuyos experimentos encontró halos de inhibición de *Staphylococcus aureus* con diámetros que varían entre 7 – 14 mm (media = 13 mm), en discos de papel filtro (diámetro = 6 mm) impregnados con extracto etanólico de propóleo al 10 % es decir un radio de inhibición medio de 6.5 mm, cabe notar la menor concentración que existe como para no hacer una comparación contundente. Esta misma concentración fue utilizada por Bankova *et al.* (1998), que, trabajando con

cuatro muestras de propóleo brasileño, utilizando extractos elaborados con etanol a 70% encontraron halos de inhibición cuyos radios varían entre 3 y 5 mm. Kujumgiev *et al.*(1999), estudiando estas mismas cuatro muestras a la misma concentración (1g/10ml) observaron halos que variaron entre 5 y 6.5 mm de radio. Dobrowolski *et al.*(1991), encontraron un radio medio de 8 mm usando una concentración de 300 mg/ml de un extracto etanólico de propóleo en Polonia.

CUADRO 9. Promedios de halo de inhibición bajo el efecto de niveles de Propóleo y los testigos.

PROPOLEO	RADIO DEL HALO DE INHIBICION (mm)	
P1 PROPOLEO 100%	2.11	c
P2 PROPOLEO 50 %	11.00	b
P3 PROPOLEO 25%	11.44	b
P4 CIPROFLOXACINA	12.56	a
P5 ETANOL	0.00	d

a,b,c,d Rangos de efectividad prueba Duncan al 5%

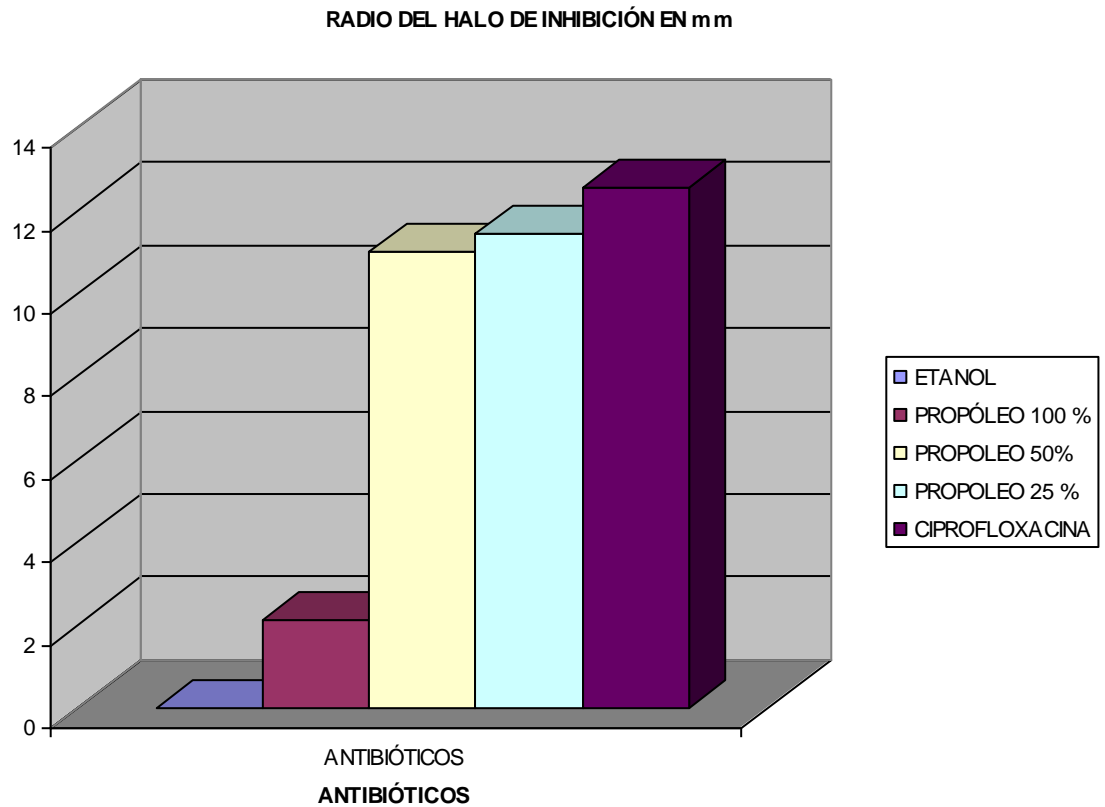


Fig. 5 Radio del halo de inhibición de los antibióticos probados en mm

Prácticamente no se manifestó ningún efecto de los niveles de concentración de las bacterias sobre el radio de inhibición pues presentaron promedios casi similares (cuadro 3).

CUADRO 10. Promedios de halo de inhibición bajo el efecto de niveles de Concentración de bacterias.

CONCENTRACIONES DE BACTERIAS	RADIO DEL HALO DE INHIBICION (mm)
C1 0.50 Mc FARLAND	7.53
C2 5 Mc FARLAND	7.07
C3 9 Mc FARLAND	7.67

Promedios de halo de inhibición bajo el efecto de niveles de concentración de bacterias

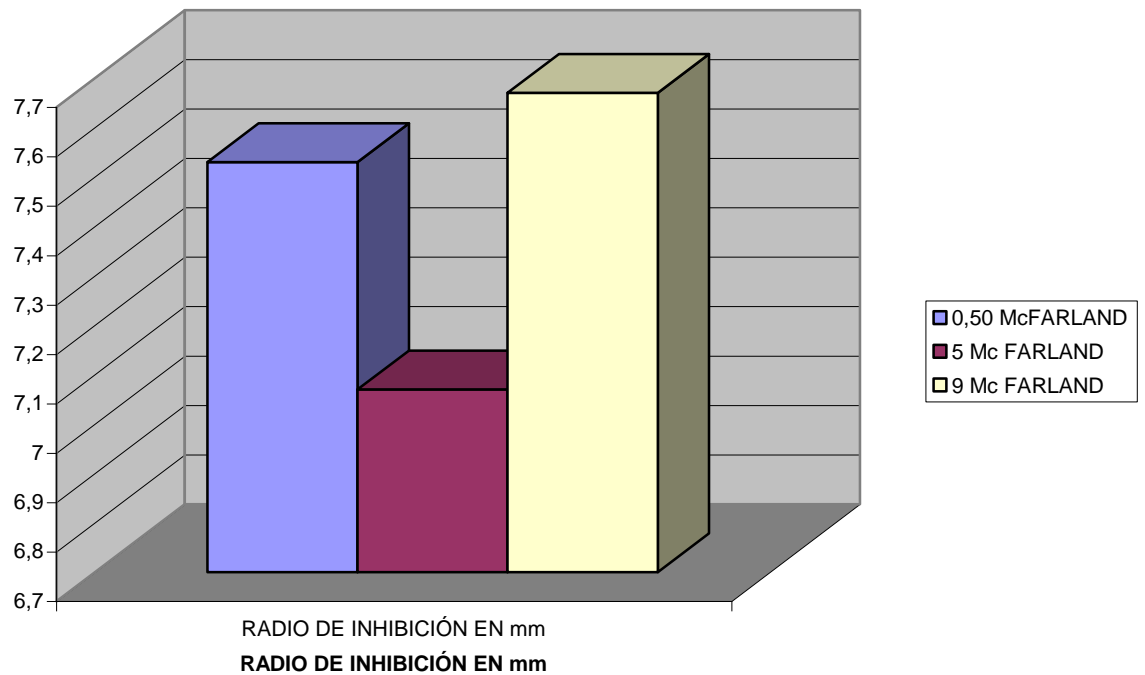


Fig 6. Promedio del halo de inhibición bajo el efecto de niveles de concentración De bacterias.

Al analizar todos los tratamientos en estudio se destacó el producto Ciprofloxacina con un radio de 15.33 mm de inhibición, el tratamiento mas cercano se presento con el 25% de Propóleo a 9 Mc Farland que presentó un promedio de 13.00 mm de radio. Es importante anotar que ha medida que se diluye más el propóleo el halo de inhibición aumenta debido al incremento de su difusión en el medio.

CUADRO 11. Promedios de halo de inhibición bajo el efecto conjunto propóleo y concentraciones de bacterias.

PROPOLEO x CONCENTACIONES	RADIO DEL HALO DE INHIBICION (mm)	
P1C1 100% PROPOLEO 0.5 Mc Farland	2.33	g
P1C2 100% PROPOLEO 5 Mc Farland	2.33	g
P1C3 100% PROPOLEO 9 Mc Farland	1.67	g
P2C1 50% PROPOLEO 0.5 Mc Farland	10.00	ef
P2C2 50% PROPOLEO 5 Mc Farland	12.00	bcd
P2C3 50% PROPOLEO 9 Mc Farland	11.00	def
P3C1 25% PROPOLEO 0.5 Mc Farland	10.00	ef
P3C2 25% PROPOLEO 5 Mc Farland	11.33	cde
P3C3 25% PROPOLEO 9 Mc Farland	13.00	b
P4C1 CIPROFLOXACINA 0.5 Mc Farland	15.33	a
P4C2 CIPROFLOXACINA 5 Mc Farland	9.67	f
P4C3 CIPROFLOXACINA 9 Mc Farland	12.67	bc
P5C1 ETANOL 0.5 Mc Farland	0.00	h
P5C2 ETANOL 5 Mc Farland	0.00	h
P5C3 ETANOL 9 Mc Farland	0.00	h

a,b,c,d,e,f,g,h.

Rangos de efectividad prueba Duncan al 5%

Promedios de halo de inhibición bajo el efecto conjunto propóleo y concentraciones de bacterias.

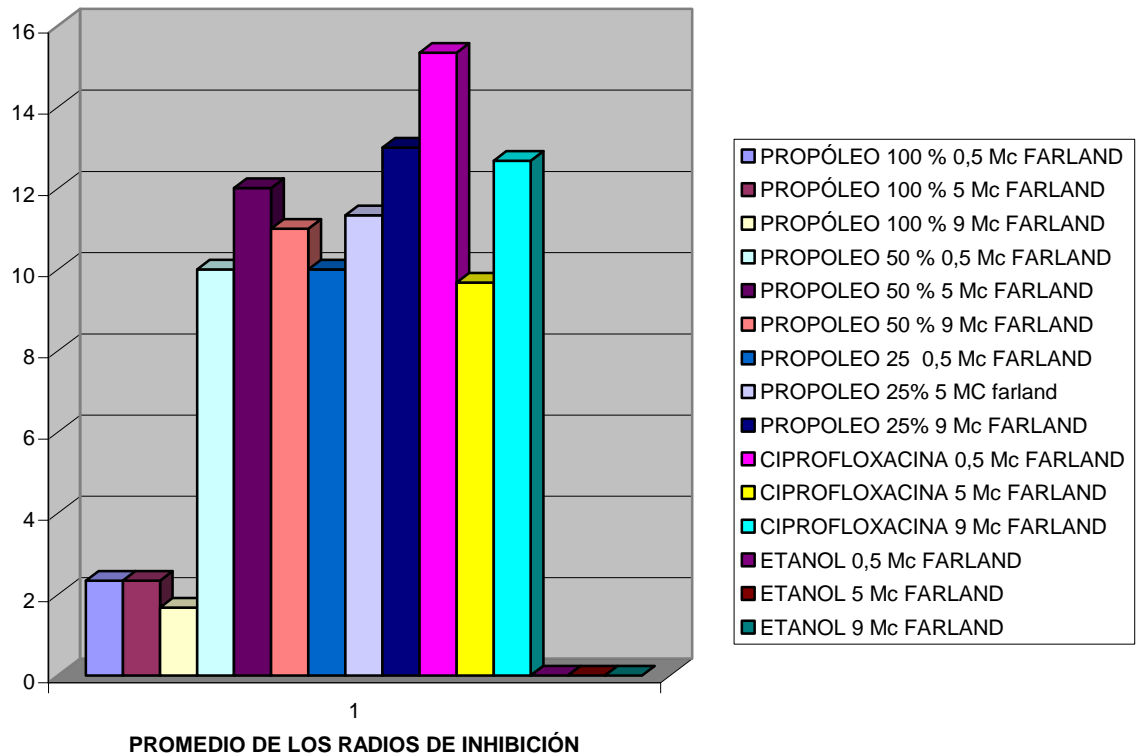


Fig. 7 Promedios del radio del halo de inhibición bajo el efecto conjunto de propóleo y concentraciones de bacterias.

Al analizar los promedios de los halos de inhibición de los tratamientos en estudio, en una forma individual en función al efecto de los niveles de propóleo y testigos con cada una de las concentraciones bacterianas, se observa que la ciprofloxacina tiene un mayor halo de inhibición 15.33 mm para la concentración bacteriana 0.5 de Mc Farland que los demás tratamientos, la dilución de propóleo al 50% tiene un mayor halo de inhibición 12.00 mm para la concentración bacteriana 5 de Mc Farland que los demás tratamientos, la dilución de propóleo al 25% tiene un mayor halo de inhibición 13.00 mm para la concentración bacteriana 9 de Mc

Farland que los demás tratamientos. El etanol se mantiene en todas las concentraciones bacterianas en 0.00 mm.

CUADRO 12. Promedio del radio del halo de inhibición de los antibiogramas bajo el efecto de los niveles de propóleo y testigos, para cada una de las concentraciones de bacterias.

PROPÓLEO %	0.5 Mc Farland	5 Mc Farland	9 Mc Farland
100	2.33	2.33	1.66
50	10.00	12.00	11.00
25	10.00	11.33	13.00
CIPROFLOXACINA	15.33	9.66	12.66
ETANOL	0.00	0.00	0.00

Promedio del radio del halo de inhibición de los antibiogramas bajo el efecto de los niveles de propóleo y testigos, para la concentración 0.5 Mc Farland de bacterias.

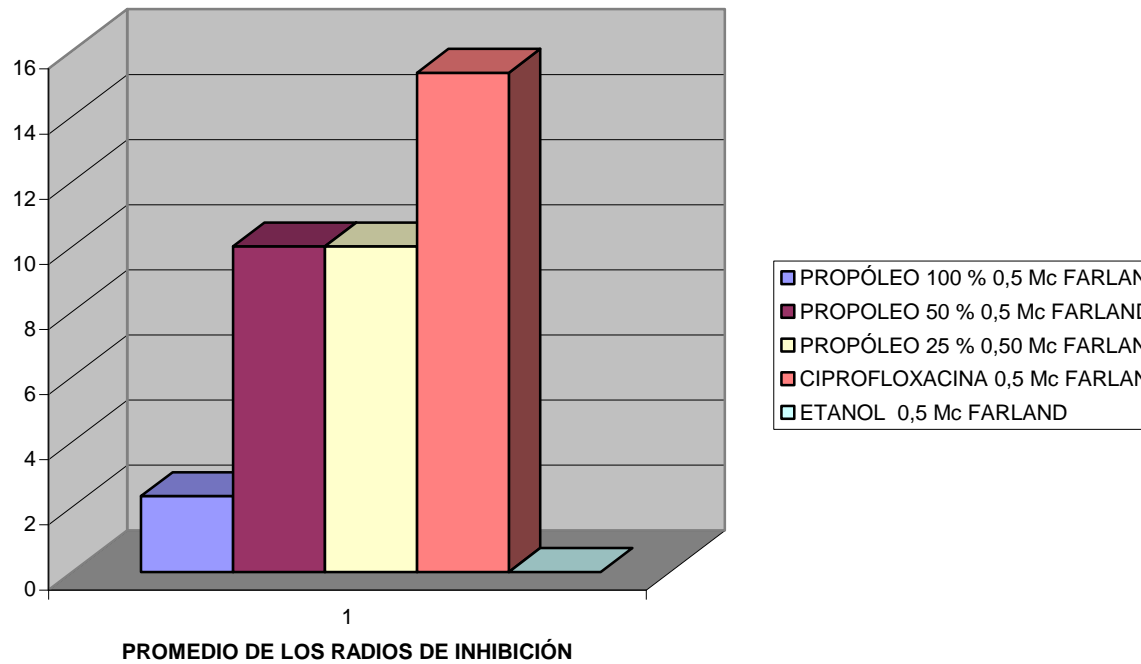


Fig. 8 Promedio del radio del halo de inhibición de los antibiogramas bajo el efecto de los niveles de propóleo y testigos, para la concentración 0.5 Mc Farland de bacterias.

Promedio del radio del halo de inhibición de los antibiogramas bajo el efecto de los niveles de propóleo y testigos, para la concentración 5 Mc Farland de bacterias.

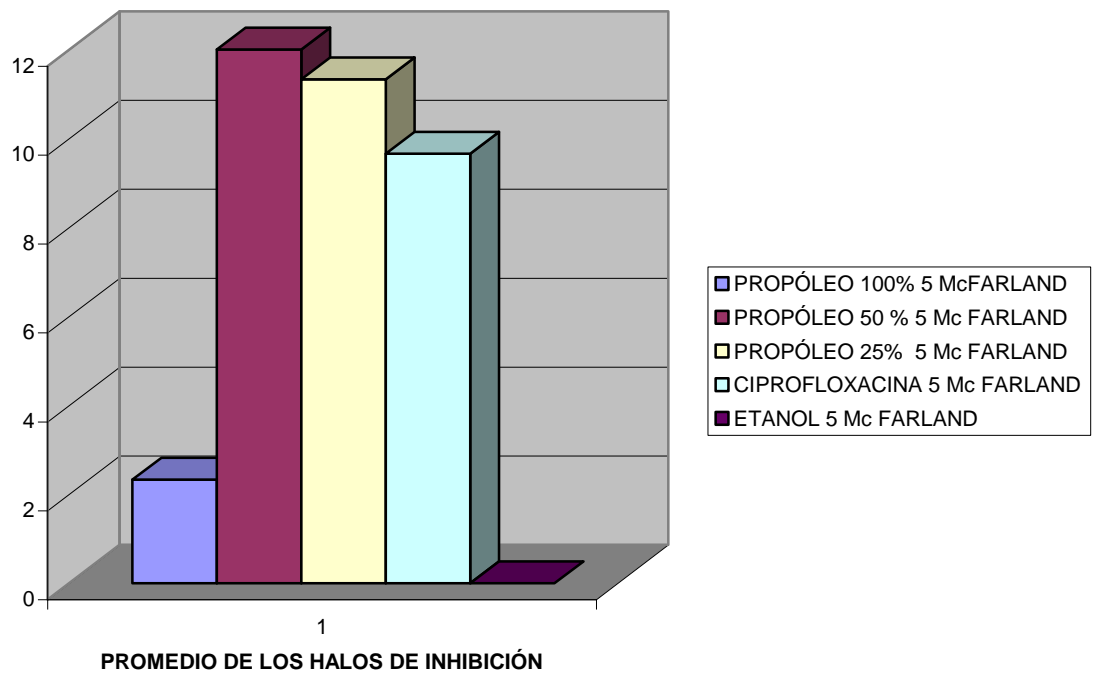


Fig. 9 Promedio del radio del halo de inhibición de los

antibiogramas bajo el efecto de los niveles de propóleo y testigos, para la concentración 5 Mc Farland de bacterias.

Promedio del radio del halo de inhibición de los antibiogramas bajo el efecto de los niveles de propóleo y testigos, para la concentración 9 de Mc farland de bacterias.

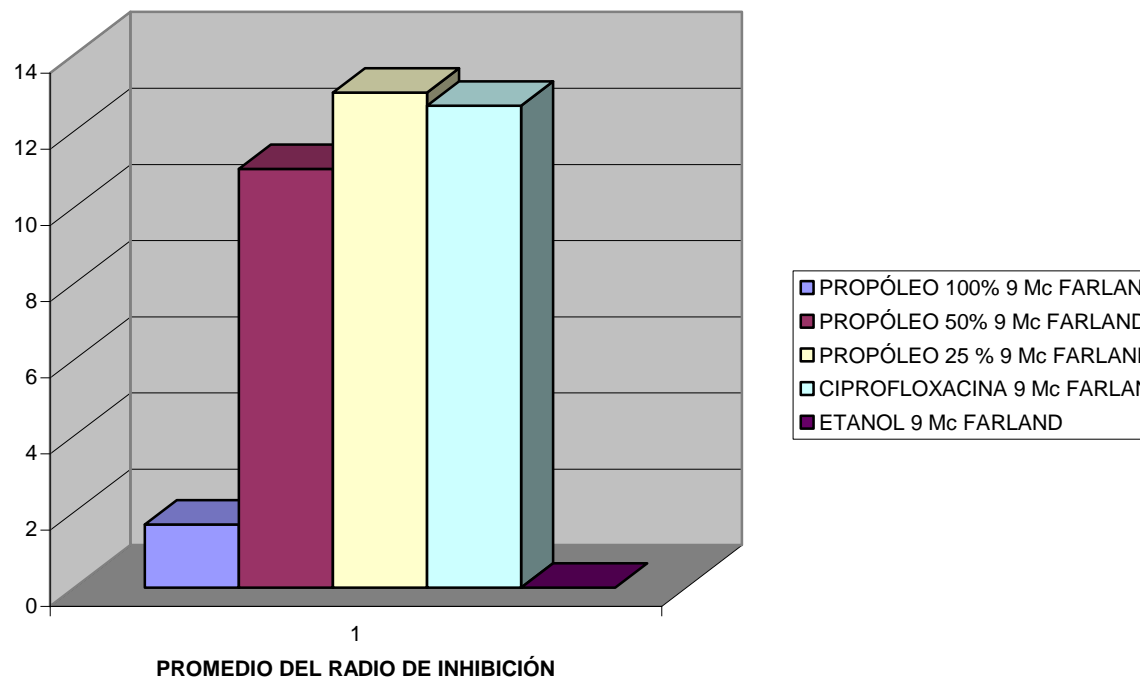


Fig. 10 Promedio del radio del halo de inhibición de los antibiogramas bajo el efecto de los niveles de propóleo y testigos, para la concentración 9 Mc Farland de bacterias.

Los resultados de la concentración mínima inhibitoria (CMI) fueron evaluados observando la existencia o no del crecimiento bacteriano sobre el medio después de solidificarse, en el cual se mezcló 1ml de la bacteria al 1 de Mc Farland, con 4 ml de Mueller-Hinton y con 1 ml de la dilución de propóleo a probarse, los resultados se observan en el cuadro 11.

Cuadro 13. Concentración mínima inhibitoria (CMI) de propóleo en*Staphylococcus aureus.*

PROPÓLEO %	CRECIMIENTO +/-
50	NEGATIVO
25	NEGATIVO
15	NEGATIVO
10	NEGATIVO
5	NEGATIVO
2	NEGATIVO
1	NEGATIVO
0.5	NEGATIVO
0.4	POSITIVO
0.3	POSITIVO

Con esto se determinó la CMI del extracto etanólico de propóleo para *Staphylococcus aureus* la cual es de 0.5-2 %, el rango de la CMI va desde la concentración mas próxima a la positiva hasta cuatro veces mas la misma.

Se debe reasaltar que los factores como la metodología adoptada en el proceso de extracción de propóleo y del método adoptado para evaluación del crecimiento bacteriano pueden alterar completamente los resultados de un experimento.

Al depender la zona de inhibición del poder de difusión del antibiótico se determinó que el propóleo, mientras más puro se encuentra, tiene menos poder de difusión en el medio para antibiograma Mueller-Hinton. Este problema también se ha detectado en la polimixina y la bacitracina que también difunden mal. (Matteh, 1992).

Esto no quiere decir que el grado de pureza del propóleo sea inversamente proporcional a su efectividad.

La concentración mínima inhibitoria aprueba la afirmación anterior ya que se necesitaron concentraciones cada vez más pequeñas para dar paso al crecimiento bacteriano, esto probó la acción bactericida fulminante de las mayores concentraciones.

Cabe destacar también que cada una de las cajas contenía 20 ml del medio logrando una altura de 4 mm desde la base, los cuales son indispensables y se encuentran estandarizados para no obtener falsas susceptibilidades por menores espesores ni falsas resistencias por espesores mayores, los cuales influyen directamente en la difusión de cualquier antibiótico a probarse.

La colección y almacenamiento del propóleo en bruto y la correcta elaboración de los extractos etanólicos de propóleo están directamente relacionados con la efectividad de estos en los antibiogramas, la masa de propóleo se debe almacenar en fundas de polietileno negro, totalmente limpias y secas no se debe exponer la masa en ningún momento al sol o a la intemperie, el local de

almacenamiento debe ser seco y ventilado. Los extractos etanólicos una vez preparados deben ser almacenados herméticamente en botellas o frascos oscuros. Al no considerar detalles que marcan esta efectividad, se obtuvieron resultados nada contundentes en los antibiogramas.

V. CONCLUSIONES

- a. La actividad de los extractos etanólicos de propóleo en los antibiogramas, dependen de la correcta cosecha, del propóleo, además de su elaboración y almacenamiento.
- b. Los extractos etanólicos de propóleo y diluciones tienen un efecto bactericida frente a colonias de *Staphylococcus aureus*, in vitro.
- c. Las diluciones de propóleo presentan una mayor actividad que el extracto puro aplicados en los antibiogramas.
- d. El extracto etanólico puro de propóleo no difunde bien en el medio.
- e. La concentración mínima inhibitoria (CMI) descartó la posibilidad de que la acción bactericida sea inversamente proporcional a la pureza de los extractos de propóleo.
- f. La Ciprofloxacina fue la que mejor reaccionó a los antibiogramas realizados con antibióticos comerciales frente a *Staphylococcus aureus*.
- g. El propóleo y sus extractos son antibióticos naturales que podrían dar soluciones prácticas, profilácticas ante la mastitis en vacas.
- h. El uso correcto de las técnicas de identificación de *Staphylococcus aureus* permitieron descartar falsos positivos en las colonias examinadas.

VI. RECOMENDACIONES

- a. Realizar pruebas de la susceptibilidad o resistencia de microorganismos, que provoquen enfermedades económicamente importantes en las diferentes especies productivas de animales, frente a extractos de propóleo.
- b. Realizar estudios de la acción de los extractos de propóleo a los demás agentes etiológicos de la mastitis bovina.
- c. Efectuar estudios comparativos de otras cualidades del propóleo, como es su acción cicatrizante, regeneradora de tejidos, antifúngica, antiviral, anestésica, antiinflamatoria, activadora del sistema inmune.
- d. Desarrollar estudios de su uso en panadizos, en castraciones, heridas infectadas, aftas, gripes de pollos, Newcastle, coccidiosis en aves, conejos, cuyes, tratamiento de tuberculosis, en el desarrollo corporal de animales productivos, en preservación de alimentos como antioxidante, evaluar la mayor eficacia de los antibióticos al usarse conjuntamente con el propóleo, en el retardo de la brotación en semillas de papa, como inhibidor del crecimiento de plantas, semillas y esporas.
- e. Realizar estudios en fitopatología ya que el propóleo proviene indirectamente de vegetales que lo usaron como medio de defensa durante millones de años.
- f. Desarrollar estudios que inciten a las abejas a producir mayor cantidad propóleo y comparar las cantidades colectadas y acción

antibacteriana en colmenares que se encuentren cerca de bosques y otros que estén cerca de cultivos extensivos.

- g. Hacer comparaciones de la actividad antibacteriana de propóleos obtenidos de diferentes zonas biogeográficas.
- h. Realizar comparaciones de la composición química de los propóleos obtenidos de diferentes zonas biogeográficas.
- i. La correcta toma de muestras de leche evita desperdiciar el tiempo Y materiales de laboratorio al no permitir la contaminación de la Leche durante la toma y transporte de las muestras al laboratorio.
- j. Es indispensable reactivar las bacterias que se encuentran en refrigeración para que en el momento de realizar la prueba de antibiograma estas se encuentren activas y no se de el caso de no observar ningún crecimiento después de la incubación, cosa que también se dio.
- k. No se debe dejar las resiembras de bacterias por más de 24 horas en la estufa, ya que estas envejecen y al igual a lo mencionado anteriormente no sirven para las pruebas de antibiograma.
- l. Las resiembras de *Staphylococcus aureus* se las debe mantener de 4- 24 °C y no por mas de tres semanas para estar seguros de su efectiva utilización.

- m. Las concentraciones de bacterias se las debe hacer preferiblemente en suero fisiológico, ya que estas bacterias son hipertónicas, es decir tienden a absorber agua hasta explotar.

- n. Durante la manipulación de las colonias de *Staphylococcus aureus* es indispensable tomar todas las medidas de precaución para no contaminarse cabe recordar el estar frente a un patógeno potencial y muy difícil de ser controlado.

VII. RESUMEN

Las mastitis en vacas causadas por *Staphylococcus aureus* son extremadamente difíciles de controlar por el tratamiento solamente, *Staphylococcus aureus* colonizan extremos del pezón o lesiones anormales del pezón. Sus toxinas destruyen las membranas de las células y pueden dañar directamente la leche producida en el tejido fino, la formación de cicatrices y abscesos dan muestra de una respuesta pobre al tratamiento antibiótico. Las células alveolares y de los conductos, pueden ser destruidas, reduciendo así la producción de leche (Jones, *et al*,1998).

La situación se torna mas crítica ya que *Staphylococcus aureus*, es resistente que en reciente a mas de 200 antibióticos como se ha demostrado en recientes investigaciones.

Con el descubrimiento de la penicilina (1928) y el advenimiento de los antibióticos modernos, se comenzó a dejar de lado el uso del propóleo y paradójicamente, en la actualidad esa tendencia ha comenzado a revertirse. Cuanto más se avanza en el descubrimiento de antibióticos más poderosos, más se necesitan conocer las propiedades terapéuticas del propóleo, que a través de sus extractos parciales o totales, se ha mostrado efectivo contra cepas de gérmenes patógenos que ya adquirieron resistencia a los antibióticos tradicionales y que curiosamente con el tiempo no han mostrado resistencia al propóleo.

En los resultados se determinó que el radio del halo de inhibición fue mayor con el producto Ciprofloxacina alcanzando un promedio de 12.56 mm, y por lo tanto

se encuentra ocupando el primer lugar del primer rango mediante la prueba de Duncan al 5%. Con etanol prácticamente no se presentó ningún halo de inhibición y por lo tanto se encuentra en el último rango. Los tratamientos con propóleo se encuentran ocupando los rangos intermedios, en donde se puede apreciar un incremento del radio del halo de inhibición a medida que este producto se encuentra más diluido.

Prácticamente no se manifestó ningún efecto de los niveles de concentración de las bacterias sobre el radio de inhibición pues presentaron promedios casi similares.

Al analizar los promedios de los halos de inhibición de los tratamientos en estudio, individualmente en función al efecto de los niveles de propóleo y testigos con cada una de las concentraciones bacterianas, se observa que la ciprofloxacina tiene un mayor halo de inhibición 15.33 mm para la concentración bacteriana 0.5 de Mc Farland que los demás tratamientos, la dilución de propóleo al 50% tiene un mayor halo de inhibición 12.00 mm para la concentración bacteriana 5 de Mc Farland que los demás tratamientos, la dilución de propóleo al 25% tiene un mayor halo de inhibición 13.00 mm para la concentración bacteriana 9 de Mc Farland que los demás tratamientos. El etanol se mantiene en todas las concentraciones bacterianas en 0.00 mm.

La CMI del extracto etanólico de propóleo para *Staphylococcus aureus* es de 0.5-2 %.

Los extractos etanólicos de propóleo presentan efectividad en los antibiogramas únicamente cuando son correctamente elaborados y almacenados.

Los extractos etanólicos de propóleo y diluciones tienen un efecto bactericida frente a colonias de *Staphylococcus aureus*, in vitro.

Las diluciones de propóleo presentan una mayor actividad que el extracto puro aplicados en los antibiogramas.

El extracto etanólico puro de propóleo no difunde bien en el medio.

La concentración mínima inhibitoria (CMI) descartó la posibilidad de que la acción bactericida sea inversamente proporcional a la pureza de los extractos de propóleo.

La Ciprofloxacina fue la que mejor reaccionó a los antibiogramas realizados con antibióticos comerciales frente a *Staphylococcus aureus*.

El propóleo y sus extractos son antibióticos naturales que podrían dar soluciones prácticas, y profilácticas ante la mastitis en vacas

VIII. SUMMARY

The mastitis caused by *Staphylococcus aureus* is difficult to control for the antibiotic treatment, because they colonize the nipples or abnormal lesions of it. Their toxins destroy the membranes of the cells and they can damage the milk produced in the fine tissue, the formation of scars and abscesses give sample from a poor answer to the antibiotic treatment. The alveolar cells and of the conduits, can be destroyed, reduce the milk production (Jones, et al,1998).

This situation is critic because *Staphylococcus aureus* is resistance in recent investigations to 200 antibiotics it was demonstrated.

The penicillin discovery (1928) and the appearing at modern antibiotics, the persons do not use propóleo and paradoxically, that tendency has begun at the present time to be reverted. The more you advances in the discovery of more powerful antibiotics, more they are needed to know the therapeutic properties of the propóleo that through their partial or total extracts, it has been shown effective against stumps of pathogens germs that they already acquired resistance to the traditional antibiotics and that surprisingly with the time they have not shown resistance to the propóleo.

In the results it was determined that the inhibition radius halo was bigger with the product Ciprofloxacina reaching an average of 12.56 mm, and therefore it is occupying the first place of the first range in Duncan to 5%. With ethanol it doesn't present any inhibition halo practically and therefore it is in the last range. The

treatments with propóleo are occupying the intermediate ranges where you can appreciate an increment at inhibition radius halo as this product finds but diluted.

Practically it didn't show any effect of the levels of concentration of the bacterias on the inhibition radius they presented almost similar averages.

The averages of the halos of inhibition of the treatments in study, was analyzing, in an individual form in function to the effect of the propóleo levels and witness with each one of the bacterial concentrations, it is observed that the ciprofloxacina has a bigger inhibition halo 15.33 mm for the bacterial concentration 0.5 of Mc Farland that other treatments, the dilution propóleo to 50% has a bigger inhibition halo 12.00 mm for the bacterial concentration 5 of Mc Farland that the other treatments, the propóleo dilution to 25% has a bigger inhibition halo 13.00 mm for the bacterial concentration 9 of Mc Farland that the other treatments. The ethanol stays in all the bacterial concentrations in 0.00 mm.

The inhibitory minimum concentration (IMC) of the etanolic propóleo extract for *Staphylococcus aureus* is of 0.5-2%.

The etanolic propóleo extract only presented effectiveness in the antibiogramas when they was elaborated and stored correctly.

The etanolic propóleo extract and dilutions have an effect germicide in front of colonies of *Staphylococcus aureus* colonies, in vitro.

The etanolic propóleo extract and dilutions present a better results when you comparated with the bigger activity that the pure extract applied in the antibiogramas.

The extract pure etanolic of propóleo doesn't diffuse in the means.

The inhibitory minimum concentration (IMC) discarded the possibility that the germicide action is inversely proportional to the purity of the propóleo extracts.

The better antibiotics commercial that eliminated to *Staphylococcus aureus* was the ciprofloxacin.

The propóleo and their extracts are natural antibiotics that could give practical solutions and prophylaxes in cow mastitis.

IX. BIBLIOGRAFÍA

Álvarez *et al*, 2001. MANUAL TÉCNICO DE MICROBIOLOGÍA CLÍNICA. Ed. Interamericana. México pp. 225 – 260.

Asís, M. 1996. APITERAPIA PARA TODOS. Ed. Científico técnica. Cuba pp. 60-96.

Bankova *et al*, 1998. COMPOSICIÓN QUÍMICA Y ACTIVIDAD ANTIBACTERIAL DE PROPÓLEOS BRASILEÑOS. Zeitschrift fur Naturforschung, v. 50, n. 3/4 ,p. 167-172.

Brumfitt *et al*, 1990. ACTIVIDAD ANTIBIOTICA DE PRODUCTOS NATURALES: 1. Propóleo. Microbios, n. 62, p. 19-22.

Davidsohn, I. 1998. DIAGNÓSTICO CLÍNICO POR EL LABORATORIO. Ed. Salvat. España pp. 985.

Deneke,J, Kleinschroth,E. y Rabold,K. 1997. LA MASTITIS, ED.EDIMED. Alemania pp.1-10.

Dobrowolski *et al*, 1991. ESTUDIO ANTIBACTERIAL, ANTIFUNGICO, ANTIINFLAMATORIO, EN PROPÓLEOS DE ABEJAS. Journal of Ethnopharmacology, v. 35, p. 77 – 82.

- Jones *et al*, 1998. ESTAFILOCOCO ÁUREO, CAUSA, DETECCIÓN Y CONTROL. (En línea). Consultado el 2 de Febrero del 2002. Disponible en: <http://www.ext.vt.edu/pubs/dairy/404-229/404-229.html>.
- Kujumgiev *et al*, 1999. ACTIVIDAD ANTIFUGICA, ANTIBACTERIAL Y ANTIVIRAL DE PROPÓLEOS DE DIFERENTE ORIGEN GEOGRÁFICO. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 64, p. 235 – 240.
- Langstroth,L. 1995. LA COLMENA Y LA ABEJA MELIFERA. Ed. Hemisferio sur. Uruguay pp. 688-691.
- Matteh, L.1992. MÉTODOS DE LABORATORIO. Ed Interamericana. Méjico pp. 930- 933.
- Philippe, J. 1990. GUÍA DEL APICULTOR, Ed. Mundiprensa. España pp. 245-246 / 323-325.
- Prost, P. 1989. APICULTURA, Ed. Mundiprensa. España pp 429-431.
- Redín,R. 1991. INVESTIGACIÓN BOTANICA – QUÍMICA DE LAS RESINAS QUE UTILIZA *Tetragunisca angustula* para fabricar su propóleo, Quito, Departamento de ciencias biológicas, Universidad Católica.
- Root,A. 1976. ABC y XYZ DE LA APICULTURA, Ed. Hachette S:A:. Argentina pp. 536-539.

Salamanca et al. 2002. COMPOSICIÓN MINERAL DE ALGUNAS MUESTRAS DE PROPÓLEO COLOMBIANO COLECTADOS POR *Apis mellifera scutellata*. Departamento de Química - Facultad de Ciencias Universidad del Tolima A. A. 546 Ibagué Tolima Colombia (En línea). Consultado el 13 de Marzo del 2004. Disponible en:

gsalaman@ut.edu.co

Sofiysky, W. 2002. GUÍA MEDICINAL DE LOS PRODUCTOS DE APICULTURA. Ed. Yema. Rusia pp.51-53; 153- 162.

X. ANEXOS

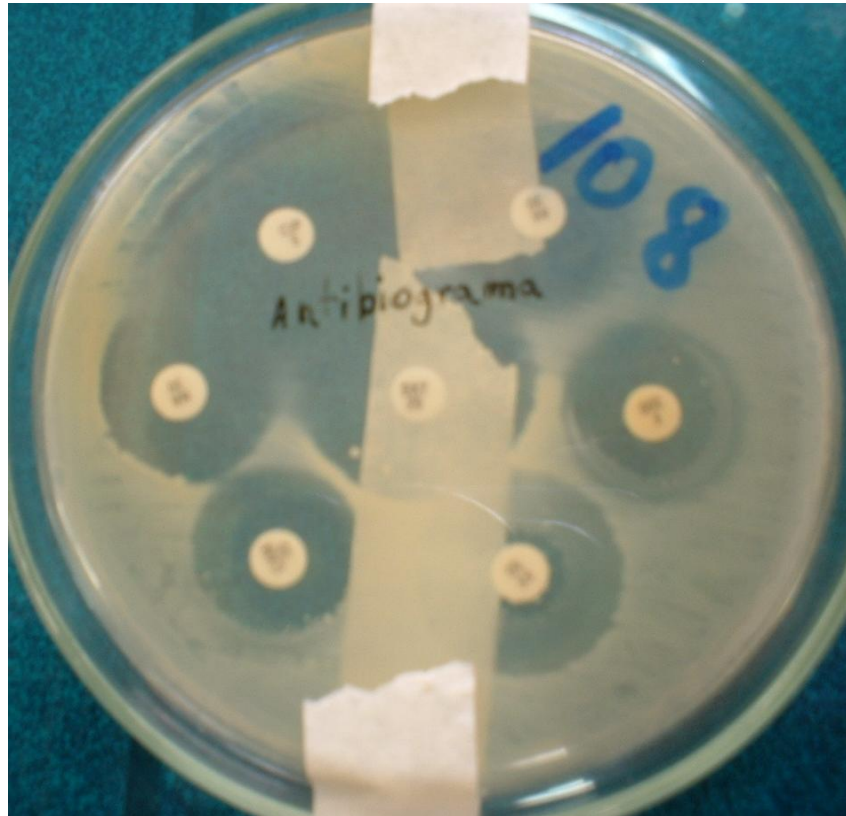


Foto 1. Antibiograma para *Staphylococcus aureus* con antibióticos comerciales en la que se determinó a la Ciprofloxacina como testigo comercial o químico.



Foto 2. Antibiogramas de la dilución de extracto de propóleo al 25 % en una concentración de izquierda a derecha de: 0.5, 5, 9 de unidades formadoras de colonias (UFC) de *Staphylococcus aureus* en la escala nefelométrica de Mc Farland.



Foto 3. Antibiogramas de la dilución de extracto de propóleo al 50 % en una concentración de izquierda a derecha de: 0,5, 5, 9 de unidades formadoras de colonias (UFC) de *Staphylococcus aureus* en la escala nefelométrica de Mc Farland.

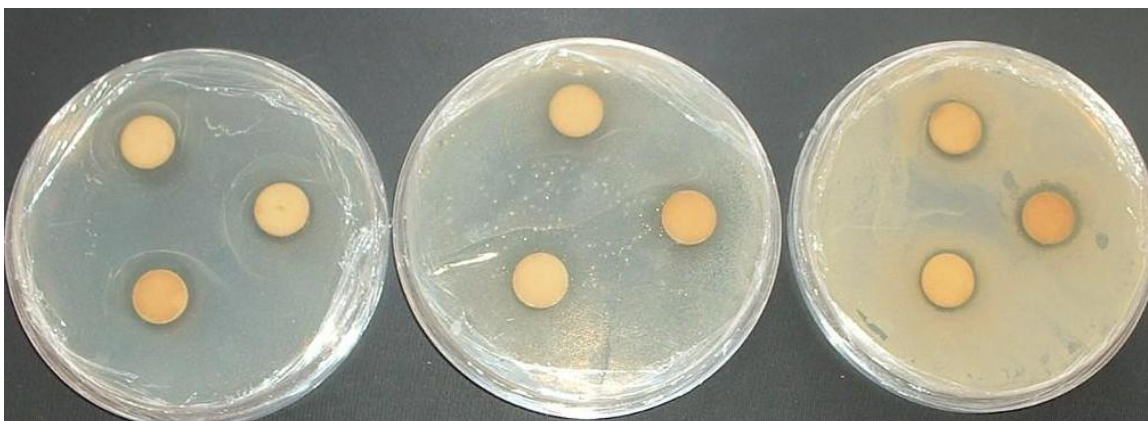


Foto 4. Antibiogramas del extracto 100% puro de propóleo en una concentración de izquierda a derecha de: 0,5, 5, 9 de unidades formadoras de colonias (UFC) de *Staphylococcus aureus* en la escala nefelométrica de Mc Farland.

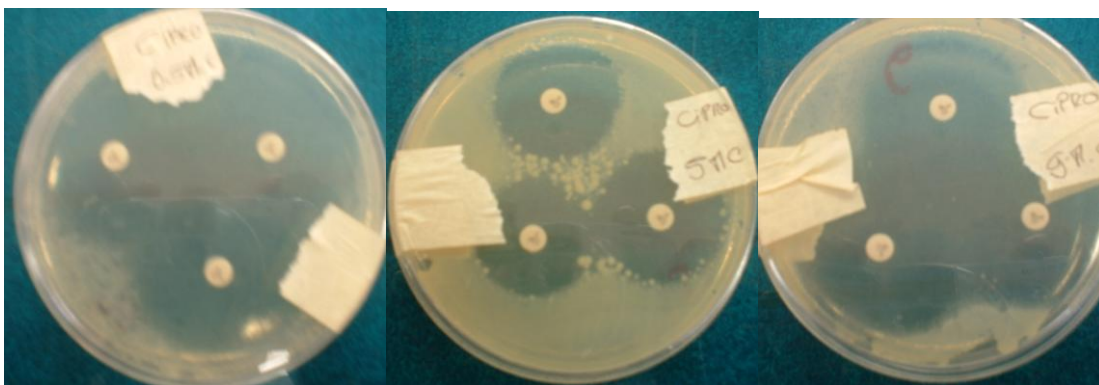


Foto 5. Antibiogramas de Ciprofloxacina en una concentración de izquierda a derecha de: 0,5, 5, 9 de unidades formadoras de colonias (UFC) de *Staphylococcus aureus* en la escala nefelométrica de Mc Farland.

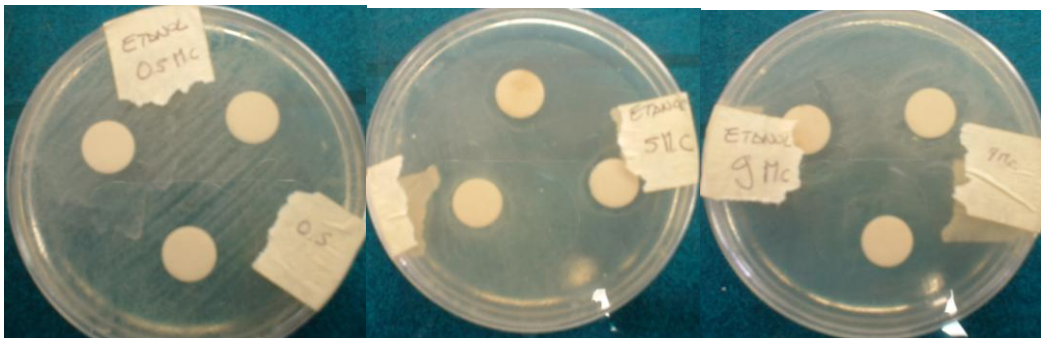


Foto 6. Antibiogramas de Etanol 96 ° (testigo absoluto) en una concentración de izquierda a derecha de: 0.5, 5, 9 de unidades formadoras de colonias (UFC) de *Staphylococcus aureus* en la escala nefelométrica de Mc Farland.