



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
CÁTEDRA DEL COMPONENTE DE INVESTIGACIÓN



“Dr. José Rafael Luna”
LABORATORIO DE SINDROMES GASTROINTESTINALES Y URINARIOS
“Prof^a. Luisa Vizcaya”

**ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA “IN VITRO” DE EXTRACTOS
ETANÓLICOS DE PROPOLEOS FRENTE A CEPAS DE *Staphylococcus
aureus* RESISTENTES A METICILINA**

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de
Licenciada en Bioanálisis**

www.bdigital.ula.ve

Autores:

Brenda P. Jaimes Hernández.

C.I. 25.720.932

Brendys N. Jaimes Hernández.

C.I. 25.720.930

Tutor(a):

Prof.^a Aurora Longa

Cotutor:

Prof. José Gregorio Hernández

Mérida, Noviembre de 2022

DEDICATORIA

Dedicar es un acto de reconocimiento a quienes han sido parte de nuestra historia y tienen un considerable significado afectivo. Este trabajo requerido para optar al título de Licenciada(s) en Bioanálisis lo dedicamos:

En primer lugar, a Dios Todopoderoso por llenar nuestras vidas de abundantes bendiciones. Hemos podido ver su amor, bondad y misericordia en cada momento y confiamos fielmente que sus planes para nosotras son mejores que los nuestros. Es un privilegio ser hijas de Dios.

En segundo lugar, al hombre más importante de nuestras vidas, nuestro amado padre. Por su entrega total para con sus hijos.

En tercer lugar, a nuestra madre por darnos la vida, y muy a pesar de estar separadas por mucho tiempo Dios nos dio la oportunidad de volver a reunirnos y ha sido grandioso contar con ella.

En cuarto lugar, a nuestro amado hermano, por estar siempre para nosotras y compartir nuestro sueño.

Brenda Jaimes y Brendys Jaimes

AGRADECIMIENTOS

Agradecer es una expresión del alma que no se desgasta con el tiempo y ensancha las puertas del corazón. De esta manera, agradecemos principalmente a Dios, el dador de la vida por acompañarnos en todo este gran recorrido y ser guía a lo largo de nuestras vidas. Ser nuestro apoyo y fortaleza en cada momento. Gracias Dios por tu amor infinito sin condición.

A nuestro padre José Ismael Jaimes, tu gran esfuerzo, dedicación, constancia, disciplina, sacrificio, trabajo y amor fueron fundamentales en nuestro día a día. Desde muy pequeñas fuiste, eres y serás nuestro superhéroe sin capa, nuestro gran ejemplo, motor e inspiración. No tenemos como agradecerte por tanto, solo espero que Dios nos permita poder devolver un poco de lo que has hecho en nuestras vidas. Eres nuestra mayor bendición papá, te amamos.

A nuestra madre Ramona Hernández. Después de haberte conocido has sido un gran apoyo incondicional sin importar la distancia entre nosotras. Gracias por animarnos a seguir adelante y vencer cualquier obstáculo que se presentara.

A nuestro hermano Otto Jaimes, el segundo hombre más importante de nuestras vidas, gracias por tu valioso apoyo en cada momento, por motivarnos y mostrarte orgulloso siempre. Eres una bendición para nosotras.

Agradecemos a nuestra amada e ilustre Universidad de Los Andes, por abrirnos las puertas para formarnos como excelentes ciudadanos y profesionales. A sus docentes y gran personal capacitado, infinitas gracias por su paciencia, dedicación y por compartir de sus valiosos conocimientos.

A nuestra tutora Aurora Longa, por habernos guiado, no solo en este trabajo de tesis, sino también como docente a lo largo de nuestra carrera universitaria.

Al Prof. José Gregorio Hernández, por su apoyo incondicional en la realización de este trabajo, su ayuda fue de vital importancia. Gracias por sus enseñanzas, por ser ejemplo de rectitud, perseverancia, valentía y aplomo para enfrentar las vicisitudes.

Prof. Evelyn Alvarez y Lic. Yacnely infinitas gracias por su aporte de manera desinteresada para la culminación de este trabajo de investigación, su ayuda fue de gran utilidad.

Prof. María Alejandra Blanco gracias por su valioso aporte a este trabajo y a nuestras vidas, sus huellas estarán por siempre en nuestro corazón.

De manera muy especial, a nuestra amada familia en Cristo, mis hermanos de la iglesia por su gran apoyo con sus oraciones, hemos podido ver la gracia de Dios a través de ustedes.

Demás familiares, tíos, primos, abuela muchas gracias por ayudarnos a mantener la esperanza y nunca desfallecer. Sus palabras de ánimo y su valioso apoyo fueron vitales en este preciado proceso. El Señor les bendiga a todos.

A nuestra querida “REFULA” por acobijarnos cada día y darnos la oportunidad de ser parte de este maravilloso hogar donde pudimos tener paz, estar seguras, y conocer excelentes personas de diferentes partes de nuestro hermoso país. A nuestro centro de estudiantes “Alianza Femenina”, maravillosas personas que Dios colocó en nuestro camino para hacer de nuestros días más alegres y divertidos, formando así una gran familia. Les amamos chicas y siempre las llevamos en el corazón.

Brenda Jaimés y Brendys Jaimés

TABLA DE CONTENIDOS

	Pág.
TABLA DE FIGURAS	ix
TABLA DE CUADROS	x
ÍNDICE DE TABLAS	xi
RESUMEN	xii
INTRODUCCION	1
Antecedentes del problema	1
El problema	6
Antecedentes de la hipótesis/antecedentes teóricos	6
Trabajos Previos	6
Antecedentes Históricos o Epistemológicos	10
Bases Teóricas	12
Aproximación teórica sobre los Metabolitos	12
Secundarios de las Plantas	13
Aproximación Teórica sobre los Tipos de Fitoquímicos	13
Presentes en las Plantas	15
Aproximación Teórica sobre la Actividad	15
Antibacteriana del Propóleo	16
Aproximación Teórica sobre los Mecanismos de	16
Resistencia a los Antimicrobianos en Bacterias	17
Aproximación Teórica sobre los Mecanismos de	17
Resistencia a Meticilina en <i>Staphylococcus aureus</i>	19
Análisis de la Actividad Antibacteriana del Propóleo	19
Obtención del Extracto Etanólico de Propóleo	19
Procedimientos para Analizar la Actividad Antibacteriana	20
del Propóleo	20
Método de Difusión de Disco en Agar	20
Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)	20
Lectura del Antibiograma con Discos Impregnados con el	21

Extracto de Propóleo	
Definición Operacional de Términos	21
Actividad Antibacteriana <i>in vitro</i>	21
Actividad Bacteriostática	21
Actividad Bactericida	22
Concentración Mínima Bactericida (CMB)	22
Operacionalización de la Variables	22
Objetivos de la Investigación	25
Objetivo General	25
Objetivos Específicos	26
MATERIALES Y MÉTODOS	26
Tipo de Investigación	26
Diseño de Investigación	27
Población y Muestra	27
Unidad de la Investigación	27
Selección del Tamaño de la Muestra	28
Sistema de Variables	28
Procedimiento de la Investigación	28
Obtención de los Extractos Etanólicos de Propóleos	28
Reactivación de las Cepas de Referencia Internacional (ATCC)	29
Reactivación de Aislados de <i>Staphylococcus aureus</i>	29
Resistentes a Meticilina de Diferentes Orígenes	
Preparación de los Discos	30
Preparación del Inóculo	31
Análisis de la Actividad Antibacteriana	31
Lectura Interpretada del Antibiograma	32
Diseño de Análisis de los Datos	32
Variables Estadísticas	33
Sistematización de los Resultados	34
RESULTADOS Y DISCUSION	35
Resultados	35

Discusión	44
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	48
Conclusiones	48
Recomendaciones	49
REFERENCIAS BIBLIOHEMEROGRÁFICAS	51

www.bdigital.ula.ve

TABLA DE FIGURAS

Nº		Pág.
1	Estructura química básica de los flavonoides	15
2	Reactivación de los aislados de <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes a metilina	30
3	Preparación de los discos impregnados con los extractos de propóleo y etanol 97%	31
4	Actividad antibacteriana de los extractos etanólicos de propóleos frente a las cepas ATCC y los aislados clínicos	43

www.bdigital.ula.ve

TABLA DE CUADROS

Nº		Pág.
1	Operacionalización de la variable actividad antibacteriana <i>in vitro</i> de los extractos etanólicos de los propóleos de diferente procedencia	23
2	Operacionalización de la variable procedencia de los extractos etanólicos de los propóleos de diferente procedencia	24
3	Operacionalización del criterio de análisis Método de Kirby Bauer para medir la sensibilidad de las cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes a meticilina.	25
4	VARIABLES ESTADÍSTICAS según la naturaleza, escala de medida e indicadores estadísticos	34

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE TABLAS

Nº		Pág.
1	Distribución de la muestra poblacional según las variables: crecimiento de las cepas en el medio nutritivo, forma de la colonia, color de la colonia, consistencia de la colonia y elevación de la colonia	37
2	Distribución de la muestra poblacional según las pruebas clave: catalasa y coagulasa	38
3	Distribución de la muestra poblacional según la fermentación del manitol.	39
4	Distribución de la muestra poblacional según la prueba de susceptibilidad a la meticilina.	40
5	Susceptibilidad <i>in vitro</i> de los extractos etanólicos de propóleos en cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes a meticilina.	41
6	Susceptibilidad <i>in vitro</i> de los extractos etanólicos de propóleos en cepas ATCC de <i>Staphylococcus aureus</i> y <i>Escherichia coli</i>	42



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
LICENCIATURA EN BIOANÁLISIS



LÍNEA DE INVESTIGACIÓN: Actividad Antibacteriana

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA “IN VITRO” DE EXTRACTOS
ETANÓLICOS DE PROPOLEOS FRENTE A CEPAS DE *Staphylococcus
aureus* RESISTENTES A METICILINA
Trabajo de Grado

Autores:

Brenda P. Jaimes H.

C.I. 25.720.932

Brendys N. Jaimes H.

C.I. 25.720.930

Tutora:

Prof.^a Aurora Longa

Asesor Metodológico:

Prof. José G. Hernández

RESUMEN

Al propóleo se le atribuyen numerosas propiedades terapéuticas sobre la salud humana, como antimicótica, antiinflamatoria, antibacteriana, entre otras. Esto resulta de la gran variedad de sus componentes bioactivos. El objetivo de este trabajo fue comparar la relación entre la actividad antibacteriana *in vitro* y los extractos etanólicos de propóleos de diferente procedencia frente a cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina. La investigación fue de tipo comparativa con un diseño de laboratorio, contemporáneo, transeccional y unieventual. Se analizaron 23 cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina. Además, se incluyeron: 1 cepa ATCC de *Escherichia coli* como control negativo y 1 cepa ATCC de *Staphylococcus aureus* como control positivo. Las cepas en estudio fueron verificadas en el Laboratorio de Síndromes Gastrointestinales y Urinarios “Lcda. Luisa Vizcaya”. La medición de la actividad antibacteriana de los extractos etanólicos de propóleos se realizó empleando el método de difusión de disco en agar. Los resultados mostraron que las tres muestras de propóleos empleadas no presentaron actividad antibacteriana ante ninguno de los aislados clínicos utilizados en este estudio. Por lo tanto, se concluyó que los propóleos provenientes de esta zona no tienen actividad antibacteriana ante estos microorganismos bajo las condiciones y métodos utilizados en el presente ensayo.

Palabras Clave: Actividad antibacteriana *in vitro*, extractos etanólicos de propóleos, *Staphylococcus aureus* meticilino resistente.

INTRODUCCIÓN

Antecedentes del problema

La actividad antibacteriana se refiere a la capacidad que posee una sustancia de origen natural o sintético de suprimir el crecimiento y desarrollo de un microorganismo. También, de destruir dicho microorganismo a bajas concentraciones, presentando escasa toxicidad en el organismo afectado; Esta actividad puede ser analizada mediante métodos analíticos fiables, rápidos y reproducibles.^{1,2} Además, es importante resaltar que existe una gran variedad de antibióticos sintéticos aplicables en medicina para el tratamiento de infecciones microbianas; sin embargo, el uso indiscriminado y prolongado de los mismos ha elevado el número de patógenos mutantes resistentes. Adicionalmente, las reacciones adversas que estos producen en algunos pacientes, ha generado el estudio de compuestos de origen natural cuyos principios activos, también, tienen la capacidad de inhibir el crecimiento microbiano.³ Este efecto producido, específicamente, por los fitoquímicos los incluye para que sean utilizados en el desarrollo de nuevos productos farmacéuticos.

Entre las fuentes naturales de fitoquímicos con actividad antimicrobiana está el propóleo o *propoli*, el cual es una sustancia resinosa de color verdoso amarillento parduzco. El propóleo es recolectado por las abejas obreras pertenecientes a la familia Apidae, principalmente la especie *Apis mellifera*. Es el exudado de diversas plantas y la adición de productos metabólicos secretados por el insecto, al cual se le incluyen otros materiales durante su elaboración, como el polen.^{4, 5, 6} Su composición química puede variar de acuerdo a la región, época de colecta, el entorno ecológico y las especies vegetales de las cuales se extraen las resinas. Este producto es utilizado por las abejas en la defensa de la colmena frente a infecciones bacterianas, para tapar las grietas en el interior de la colmena a fin de reducir la entrada a la misma

por parte de intrusos, e impedir el exceso de aire o de humedad que pueda alterar el equilibrio^{7, 8}.

En cuanto a los extractos etanólicos de propóleos (EEP), estos se obtienen mediante la técnica de extracción con etanol en múltiples etapas. Se hace con el fin de purificar el extracto eliminando el material no deseado y conservando la fracción activa rica en componentes fenólicos, sin parafina y otros contaminantes. De esta manera, se logra obtener el extracto de propóleo con un mayor alcance del efecto de sus propiedades⁹.

Esta investigación fue respaldada por varias aproximaciones teóricas. Entre ellas, se consideraron los metabolitos secundarios de las plantas y los tipos de fitoquímicos, a los cuales se les atribuye las diversas propiedades farmacológicas¹⁰⁻¹² que se han comprobado en el propóleo. También, está sustentada por la aproximación teórica sobre la actividad antibacteriana del propóleo, la cual explica que esta propiedad es atribuida a la variabilidad de su composición química^{6, 13}. Por último, la aproximación teórica sobre los mecanismos de resistencia de las bacterias, cuyo fin es evadir la respuesta inmune y, de esta manera, aumentar su virulencia en el huésped^{14,15}.

Es indudable que el fenómeno de resistencia de diversos microorganismos a los antimicrobianos, representa una amenaza para la salud pública mundial. Por eso, la organización Mundial de la Salud¹⁶ consideró como un riesgo la propagación de esta resistencia, ya que compromete la eficacia de los antimicrobianos. Así, también, varios investigadores, motivados por este problema, publicaron los resultados de investigaciones primarias, realizadas en los últimos 5 años sobre la propiedad antibacteriana del propóleo. Al respecto, Fernández, *et al.* (2021) realizaron un estudio en el que compararon los halos de inhibición generados por ocho antibióticos y los generados por cuatro concentraciones alcohólicas de propóleos en una cepa de *Staphylococcus aureus*, mediante actividad *in vitro*. Ellos observaron que las cuatro diluciones etanólicas del propóleos inhibieron el crecimiento del

microorganismo analizado¹⁷. A su vez, Fuentes, *et al.* (2021) analizaron la actividad antimicrobiana del propól-5, un extracto etanólico de propóleos cubano. Los resultados de esta investigación demostraron que el extracto etanólico de propóleo cubano presenta actividad antibacteriana significativa frente a las cepas de referencia y los aislados clínicos probados, entre los cuales estaba *Staphylococcus aureus*¹⁸.

Entre otras evidencias actuales, Sanpa *et al.* (2017) también examinaron las propiedades antimicrobianas y la composición química de los propóleos tailandeses. Utilizaron métodos cromatográficos y concentración mínima inhibitoria (CMI) para estudiar la actividad antimicrobiana en cepas grampositivas, gramnegativas y en levaduras. El resultado de esta investigación demostró mayor actividad antibacteriana frente a bacterias grampositivas que en gramnegativas¹⁹. Todas las evidencias mencionadas revelaron la importancia de la actividad antimicrobiana del propóleo.

La situación de este problema de investigación, junto al fundamento teórico, fue considerada por los autores de este proceso indagatorio para dilucidar las razones que la justificaron. Estas razones estimularon la selección del tema de investigación y fueron representadas por: necesidades, curiosidades, preocupaciones y motivaciones, intereses, valores, potencialidades, oportunidades, contradicciones; tal como lo propuso Hurtado²⁰. En tal sentido, los autores de esta investigación identificaron necesidades tales como: es necesario el estudio de otras alternativas para el desarrollo de nuevos antimicrobianos debido a la disminución de la eficiencia de la actividad bacteriostática y bactericida de estas sustancias, utilizadas en el tratamiento frente a patógenos. Esto es consecuencia de los mecanismos de resistencia que se generan constantemente¹⁶, desarrollados por las bacterias mediante modificaciones de vías metabólicas y enzimáticas. También, por alteraciones de la permeabilidad de la membrana y en el sitio de unión de la célula diana. Además, el uso inadecuado de los antibióticos contribuye

con la resistencia y la disminución de la eficacia del tratamiento de la infecciones¹⁴.

En el mismo orden de ideas, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (SARM) es reconocido como uno de los principales agentes patógenos causantes de la mayoría de las infecciones nosocomiales. Esto es debido al aumento progresivo de mutaciones que le han conferido resistencia a una gran variedad de antibióticos; específicamente, a los β -lactámicos. En consecuencia, esto ha generado un incremento significativo, en los últimos años, de los porcentajes de mortalidad entre los pacientes infectados²¹.

Reuniendo los por qué anteriores, los investigadores de este trabajo, además, establecieron razones con categoría de potencialidad. Entre ellas, el hecho de que el propóleo posee gran actividad frente a cocos grampositivos y algunas bacterias gramnegativas, dependiendo de la dosis, almacenamiento del producto, contenido de flavonoides y capacidad inhibitoria²². Específicamente, porque el propóleo contiene una extensa variedad de compuestos y principios activos que le confieren propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias y estimulantes de la respuesta inmune. Por lo tanto, resulta un interesante foco de estudio para el descubrimiento y desarrollo de nuevas alternativas para el tratamiento de infecciones bacterianas²².

Finalmente, los autores de esta investigación focalizaron su interés sobre la actividad antibacteriana *in vitro* de los extractos etanólicos de propóleos de diferente procedencia frente a cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina, desde el punto de vista comparativo por varias razones. Primera, la prevalencia de infecciones bacterianas multirresistentes requiere urgentemente investigaciones de otras opciones terapéuticas procedentes de fuentes naturales. Segunda, la compleja composición química del propóleo le confiere propiedades antimicrobianas que pudieran originar nuevos fármacos, minimizando los daños colaterales. Tercera, los riesgos de resistencia de algunos patógenos frente al propóleo son sumamente bajos debido a la falta de

exploración en el área. Además, sus principios activos están biológicamente equilibrados, evitando que se acumulen en el organismo.

Durante el planteamiento del problema de esta investigación se consideraron varios aspectos que revelaron los alcances de este proceso indagatorio. En este sentido, Hurtado²⁰ refirió que los alcances están asociados con la profundidad del conocimiento que se quiere generar. Al respecto, esta investigación tuvo un alcance comparativo, ya que se intentó comparar la actividad antibacteriana del propóleo procedente de 3 zonas. Adicionalmente, el alcance analítico fue preponderante para obtener los datos sobre la actividad antibacteriana y la interpretación de la misma.

Entre otros aspectos, durante las fases de la investigación fue importante considerar la viabilidad de la investigación, tanto en los tiempos del proyecto como en la ejecución del mismo; pues, es imprescindible asegurar el cumplimiento de cada fase para que se pueda obtener la respuesta a la pregunta de investigación. Al respecto, Hurtado²⁰ refirió varias preguntas relacionadas con la viabilidad de la investigación e indirectamente con las limitaciones. Las preguntas son: ¿cómo?, ¿con qué? y ¿cuánto? Es decir, es importante estar pendiente del método de investigación, de las técnicas y de las estrategias. Durante esta investigación no se presentaron limitaciones relacionadas con el método; pues, se logró aclarar que la profundidad del alcance fue comparativo. Respecto a los recursos materiales, las necesidades de algunos reactivos fueron solventadas. Adicionalmente, las necesidades teóricas fueron solucionadas con las búsquedas en las bases de datos. Entre otros, los aspectos económicos y el tiempo de investigación fueron alterados por las consecuencias de la pandemia Covid-19; sin embargo, con las estrategias implementadas se logró mantener la investigación.

El problema

Una vez planteado el problema de investigación, los autores formularon el siguiente enunciado holopráxico:

¿Cuáles son las diferencias y semejanzas entre la actividad antibacteriana *in vitro* y los extractos etanólicos de 3 tipos de propóleos frente a cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina, en el Laboratorio de Síndromes Gastrointestinales y Urinarios “Lcda. Luisa Vizcaya” de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, desde Junio de 2019 hasta Diciembre de 2022?

Antecedentes teóricos

Trabajos previos

Fernández *et al.* (2021) publicaron un artículo original en la revista *Journal of the Selva Andina Research Society*, titulado: Comparación de actividad *in vitro* anti-*Staphylococcus aureus* de ocho antibióticos y cuatro diluciones de propóleos. El objetivo fue comparar los halos de inhibición de la actividad *in vitro* anti-*Staphylococcus aureus* de ocho antibióticos y cuatro diluciones de propóleos. La investigación fue observacional y de tipo comparativa, con diseño de laboratorio, contemporáneo, transeccional y multieventual. Se incluyó una cepa de *Staphylococcus aureus* perteneciente al banco de cepas del Centro de Higiene y Epidemiología de la provincia de Sancti Spíritus, Cuba y se utilizaron cuatro diluciones de propóleos (5%, 10%, 15% y 20%). Además, se utilizaron discos de ocho antibióticos usados en el control de *S. aureus* (amikacina, cloranfenicol, tetraciclina, penicilina, doxiciclina, ciprofloxacina, cotrimoxazol y eritromicina). Los procedimientos fueron: se prepararon las diluciones de los extractos etanólicos de propóleos tomando en cuenta el método descrito por Sforcin. La siembra de *S. aureus* se realizó en dieciocho placas de Petri con medio agar nutriente.

Respectivamente, a las seis placas restantes se le adicionaron discos de papel de filtro embebidos durante 24 horas con las diluciones de propóleos (5%, 10%, 15% y 20%). Luego, fueron incubados a 37°C/24 horas; posteriormente, se midieron los halos de inhibición producidos por los antibióticos y las diluciones etanólicas de propóleos. Los resultados fueron: la actividad antibacteriana de las cuatro diluciones etanólicas de propóleos produjeron halos de inhibición entre 10 y 20 mm, contra el microorganismo. De los ocho antibióticos con los que se realizó la comparación en este estudio, solo la eritromicina fue resistente el *S. aureus*, la penicilina produjo los halos con menores dimensiones. El resto de los antimicrobianos produjeron halos mayores a los del propóleos; sin embargo, la mayoría se encontraron dentro del rango originado por este producto. Los autores concluyeron: los halos originados por las cuatro diluciones etanólicas de propóleos presentaron similitudes a los halos producidos por los antibióticos. Por esta razón, los extractos etanólicos de propóleos podrían ser una alternativa en tratamientos antibacterianos¹⁷. Este trabajo respaldó la presente investigación, ya que los autores consideraron un evento de estudio similar; además, de proporcionar información relevante respecto a la actividad antibacteriana del propóleo en comparación con los antibióticos de uso en la salud.

Los autores Fuentes *et al.* (2021) publicaron un trabajo en la Revista Cubana de Farmacia, titulado: Actividad antimicrobiana de varias concentraciones del propol-5, un extracto etanólico de propóleos cubano. El objetivo de esta investigación fue confirmar *in vitro* la actividad antimicrobiana de varias concentraciones de 4 lotes del propol-5 (CIBHO®). Esta investigación fue confirmatoria. El diseño fue contemporáneo, transversal, de laboratorio, experimental y multieventual. Los procedimientos fueron: se analizó la actividad antimicrobiana *in vitro* de cuatro lotes de propol-5 entregados al CIBHO por parte de la empresa APICUBA. Para la determinación de la concentración mínima inhibitoria se empleó el método de microdilución en caldo frente a cepas de referencia y aislados clínicos multirresistentes. Los resultados fueron: se

evidenció la actividad antimicrobiana del propol-5 frente a las cepas de referencia utilizadas en este estudio, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (CMI= 3,12-25 mg/mL), *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (CMI= 12,5 mg/mL), *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (CMI= 6,25-12,5 mg/mL y CMI= 6,25-25 mg/mL, respectivamente), *Candida albicans* ATCC 90028 (CMI=1,56-6,25 mg/mL) y *Candida krusei* ATCC 6258 (CMI= 3,12-12,5 mg/mL). Así mismo, el propol-5 mostró actividad antimicrobiana frente a aislados clínicos de *S. aureus*, cuya CMI osciló entre 3,12-12,5 mg/mL; para *P. aeruginosa* y *Candida* spp. fue inferior, 3,12-6,25 mg/mL y 1,56-6,25 mg/m, respectivamente. No se encontraron diferencias significativas entre estos valores (p-valor > 0,05). Los autores concluyeron: la efectividad del Propol-5 (CIBHO®) para inhibir el crecimiento de levaduras y de bacterias grampositivas y gramnegativas confirma la actividad antimicrobiana que se dedujo para él a partir de la caracterización de otros extractos etanólicos de propóleos. Su actividad ante cepas clínicas multirresistentes permite, ante infecciones producidas por estas cepas, proponerlo como una alternativa terapéutica a considerar¹⁸. Este estudio fue relevante, ya que aportó datos acerca de la actividad antimicrobiana presente en los extractos etanólicos de propóleos frente a aislados clínicos multiresistentes como cepas SARM.

Los investigadores Sanpa *et al.* (2017), publicaron un artículo en la revista *Chiang Mai Journal of Science* de la Universidad de Chiang Mai en Tailandia, titulado: *Chemical profiles and antimicrobial activities of Thai propolis collected from Apis mellifera*. El objetivo fue confirmar la actividad antimicrobiana relacionada con la composición química y varias concentraciones del propóleo tailandes de la especie *Apis mellifera* provenientes de diferentes lugares. Esta investigación fue de tipo confirmatoria. El diseño fue contemporáneo, de laboratorio, transversal, experimental y multieventual. Los procedimientos fueron: se prepararon diluciones de extractos etanólicos de propóleos que oscilaron entre 0,6 mg/ml y 128 mg/ml. A su vez, los perfiles químicos de todas las muestras de propóleos se obtuvieron por métodos cromatográficos. Se utilizaron

diez microorganismos de prueba adquiridos del Departamento de Ciencias Médicas, Ministerio de Salud Pública (DMST), Bangkok, Tailandia (*Klebsiella pneumoniae* DMST 8216, *Listeria monocytogenes* DMST 17303, *Micrococcus luteus* DMST 15503, *Proteus mirabilis* DMST 8212, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus epidermidis* DMST 15505, *Streptococcus pyogenes* DMST 17020, *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina DMST 20625, *Serratia marcescens* DMST 21632, y *Salmonella typhimurium* DMST 562). Así mismo, se utilizaron otros cinco microorganismos provenientes del Instituto de Investigación Científica y Tecnológica de Tailandia (*Bacillus cereus* TISTR 687, *Escherichia coli* ATCC 25922, *S. aureus* TISTR 517, *Candida albicans* ATCC 10231, y *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5343). La actividad antibacteriana se analizó a través de CMI en una placa de 96 pocillos. Los resultados fueron: Todas las muestras de propóleos presentaron una actividad antimicrobiana significativa frente a bacterias grampositivas (*Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* y *S. aureus* resistente a meticilina). Mientras que, contra bacterias gramnegativas y levaduras era inferior. Se observaron diferencias estadísticamente significativas (p -valor $< 0,001$) entre los extractos de propóleos tailandeses debido a su actividad de eliminación de radicales libres DPPH y contenido fenólico total. Los perfiles químicos de GC/MS de todas las muestras de propóleos demostraron una composición similar, pero, con diferente proporción de azúcares y derivados de azúcar, triterpenos y lípidos, siendo la muestra (Phayao) la que presentó mayor actividad antibacteriana. Además, el perfil químico mostró que pertenecía al tipo de propóleo tropical, procedente principalmente del mango (*mangifera indica*). Los autores concluyeron: los extractos etanólicos tailandeses poseen importantes propiedades antimicrobianas, especialmente contra *S. epidermidis*. Proporcionando información útil para la futura estandarización del propóleos tailandés¹⁹. Este estudio fue importante para esta investigación, ya que aportó datos interesantes acerca del evento de estudio escogido por los autores de esta investigación.

Antecedentes históricos

Durante los últimos años se han publicado muchas investigaciones acerca de la composición química, la actividad biológica y los usos farmacológicos y terapéuticos del propóleo. Sin embargo, existe evidencia histórica que el uso del propóleo y el reconocimiento de sus propiedades antisépticas es antiguo y se remonta al menos a 300 a. C, cuando se utilizaron sus propiedades resinosas en el embalsamiento de cadáveres por los egipcios, así como para sanar heridas, llagas y úlceras por los antiguos griegos a quienes se les debe el nombre del propóleo y los romanos quienes lo utilizaron como medicina de emergencia para las heridas causadas durante la guerra. Aristóteles lo recomendó como antiséptico para tratar abscesos y heridas, así como también Discórides, Plenio, Galeno y los médicos árabes.^{23- 25}

Las investigaciones sobre la composición del propóleo se iniciaron a principios de 1900, debido a las dudas acerca del origen vegetal que presentaban los primeros observadores de las abejas. El primer trabajo científico se publicó en 1908, donde Helfenberg menciona que la composición del propóleo varía con su origen al observar que las abejas obtuvieron propóleos de las ramas de capullo y hojas de los abedules, fresnos y bálsamos. Posteriormente se confirmó el origen vegetal del propóleo en una investigación publicada por Rosch en 1927 y que luego sería convalidada por Vansell y Bisson años después cuando examinaron el propóleo como un subproducto contaminante de la cera de abejas que no tenía valor de mercado, en su trabajo publicado en 1940²³.

No obstante, el reconocimiento del propóleo como una alternativa en el tratamiento de problemas de salud no generó interés sino hasta los años 1950 y 1960 cuando se comenzó a utilizar sus propiedades en diversas patologías y dolencias con resultados satisfactorios en la antigua Unión Soviética y Europa del Este ²⁴.

Debido a esto, en 1979 fue publicado por Ghisalberti²³ el primer artículo de revisión acerca de la composición química del propóleo, llegando a la

conclusión de que éste no debería ser recomendado para fines terapéuticos debido a los escasos estudios llevados a cabo hasta la época, y teniendo como principal problema la variabilidad que presentaba en su composición química. El interés del propóleo como un producto complementario importante en la medicina se incrementó a partir de 1980 en países de Europa Occidental, en Norte y Sur América, así como en Japón y fue hasta 1985 cuando se produjo el primer anuncio importante acerca del propóleo como una posibilidad prometedora en farmacología en ese país²⁴. Dos décadas después había una considerable información sobre la composición química y la actividad biológica del propóleo, aunque lo referente a su aplicación en la terapia apenas estaba comenzando a cambiar⁶.

En el propóleo se han determinado más de 180 compuestos diferentes principalmente flavonoides a los que se les atribuye las propiedades antioxidantes, inmunoestimulante, antiinflamatorio, antifúngica, analgésico antiviral y antibacteriana, esta última considerada una de las más importantes y más estudiada en los últimos años sobre una gran variedad de cepas bacterianas^{6, 26, 27}. Encontrándose mayor efectividad sobre las bacterias grampositivas^{28, 21}, por lo que diversos autores han centrado sus estudios en los últimos años en el género *S. aureus*. El cual representa un problema grave en materia de salud a nivel mundial debido a su variabilidad, la rápida respuesta adaptativa frente a cambios del medio, y su continua adquisición de determinantes de resistencia antibiótica. Lo que genera ineficiencia en el tratamiento de infecciones intrahospitalarias, propagándose hasta la comunidad. Siendo el *S. aureus* resistente a meticilina (SARM) el que presenta mayor importancia clínica¹⁵.

Diversos autores han analizado en las últimas décadas la efectividad del propóleo frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, obteniendo resultados satisfactorios^{27, 28}. Las primeras investigaciones se publicaron a mediados del año 2000, y posteriormente se han ido incrementando, con evidencias cada vez más claras que demuestran la actividad antibacteriana del propóleo frente a este género²⁷⁻³¹. En Venezuela, las

investigaciones con respecto a esta sustancia han ido en aumento durante los últimos años. Para el año 2012, Gil, Perelli, *et al.* Evaluaron la tintura de propóleos proveniente de un apiario del Estado Cojedes sobre bacterias enteropatógenas ATCC, demostrando que la tintura de propóleos tiene actividad bacteriostática y bactericida *in vitro* en las cepas estudiadas. Evidenciando que el propóleos puede ser una alternativa en el tratamiento de infecciones causadas por estos patógenos³².

Otro estudio es llevado a cabo en el año 2015, por Gil, Gonzales, *et al.* Quienes demuestran mediante una investigación realizada en la Facultad de Medicina de la Universidad de los Andes la existencia de actividad antibacteriana de extractos etanólicos de propóleos venezolanos y europeos frente a cepas de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Observando un efecto bacteriostático y bactericida de todos los extractos en ambas bacterias, alcanzando su actividad a una concentración más baja en bacterias grampositivas y cotejando la calidad de los propóleos venezolanos con la de los europeos. Sin embargo, aún existen pocos estudios realizados en el país respecto al tema, debido al desconocimiento acerca de este producto recolectado por las abejas y sus propiedades farmacológicas²⁸.

Bases teóricas

Aproximación teórica sobre los metabolitos secundarios de las plantas

Las funciones metabólicas, universalmente reconocidas, que realizan las plantas son necesarias para su funcionamiento, y se les ha denominado en conjunto: metabolismo primario. Pero, a diferencia de otros organismos, las plantas son poseedoras casi exclusivas de otras rutas metabólicas a través de las cuales sintetizan una amplia gama de sustancias que no parecen tener una función directa en procesos de crecimiento, desarrollo o reproducción, llamadas: metabolitos

secundarios¹⁰. Los metabolitos secundarios son compuestos que derivan del metabolismo primario y difieren de estos. Según Avalos (2009) en su trabajo sobre los metabolitos secundarios expresó:

Los metabolitos secundarios además de no presentar una función definida en los procesos mencionados, difieren también de los metabolitos primarios en que ciertos grupos presentan una distribución restringida en el reino vegetal, es decir, no todos los metabolitos secundarios se encuentran en todos los grupos de plantas. Se sintetizan en pequeñas cantidades y no de forma generalizada, estando a menudo su producción restringida a un determinado género de plantas, a una familia, o incluso a algunas especies.

Se considera que más de 100.000 metabolitos secundarios son producidos por las plantas. Aproximadamente, 1600 estructuras químicas nuevas se describen cada año, la mayoría de ellas con actividad biológica. Muchos de ellos forman parte de los mecanismos de defensa contra herbívoros, virus, hongos y bacterias. Algunos tienen función fisiológica, ecológica y, además, son una fuente importante de principios activos de medicamentos y de valiosos productos químicos empleados en la industria cosmética, alimentaria y farmacéutica. De manera muy general, los metabolitos secundarios han sido clasificados en tres grandes grupos de acuerdo a su origen biosintético: fenoles, terpenos y compuestos nitrogenados^{10, 11}.

Aproximación teórica sobre los tipos de fitoquímicos presentes en las plantas

Los terpenos, fenoles y compuestos nitrogenados son fitoquímicos o compuestos secundarios presentes en las plantas. Los terpenos también llamados terpenoides o isoprenoides, presenta una unidad estructural formada por un compuesto de cinco átomos de carbono llamado Isopentenil pirofosfato, el cual es rápidamente interconvertido a

dimetilalil pirofosfato. El nombre de isoprenoides fue dado porque estos compuestos se descomponen a temperaturas altas y producen isopreno. Este grupo a su vez se divide de acuerdo al número de unidades de isopreno que presenten en monoterpenos (dos unidades de isopreno), sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, tetraterpenos y politerpenos. Es importante resaltar que estos compuestos presentan actividades biológicas muy diversas¹².

Por otra parte, los compuestos fenólicos, fenoles o polifenoles, son sustancias que poseen al menos un anillo aromático con un radical hidroxilo sustituyente en su estructura química, es decir un grupo fenólico. En este grupo se incluyen: los ácidos fenólicos, cumarinas, taninos y flavonoides; estos últimos son los más abundantes y diversos, pues presentan la distribución más amplia en el reino vegetal. Pueden encontrarse unidos a un glucósido, de esta manera los flavonoides poseen un anillo de benceno condensado con un anillo heterocíclico de seis miembros que presenta un anillo fenil como sustituyente en la posición 2. También pueden encontrarse sin residuo de azúcar en su molécula. La diversidad química de los flavonoides se debe, en su mayoría, a diferencias en el nivel de oxidación del anillo heterocíclico o a los diferentes patrones de hidroxilación, glicosilación, metilación, acilación. Esto permite clasificarlos en cinco diferentes tipos: flavanonas, dihidroflavonoles, dihidrochalconas, flavanos y flavanoles. Las aplicaciones farmacéuticas de estos compuestos son amplias, desde antibacterianos, antioxidantes, antitumorales, entre muchas otras^{11, 12}.

En cambio, los compuestos nitrogenados son químicamente muy heterogéneos, este grupo lo conforman principalmente los alcaloides y glucósidos cianogénicos. Los alcaloides son una amplia familia de compuestos que tienen más de 15.000 metabolitos secundarios. Además, contienen al menos un átomo de nitrógeno en su molécula, son solubles en agua y exhiben actividad biológica. Específicamente, en los seres humanos generan respuestas fisiológicas y psicológicas, la mayoría, como consecuencia de su interacción con neurotransmisores. Por otra

parte, los glucósidos cianogénicos son considerados los metabolitos secundarios con mayor relación con las funciones de defensa^{11, 12}.

Aproximación teórica sobre la actividad antibacteriana del propóleo

La actividad antibacteriana del propóleo se le atribuye a su composición química, la cual es bastante compleja y depende básicamente de las fuentes vegetales donde se originaron y de la función específica dentro de la colmena^{6, 13}. Básicamente, está compuesto por: 30-40% de cera de abejas, 5-10% de aceites esenciales o volátiles y ácidos aromáticos, 5% de polen y 5% de materiales diversos (orgánicos y minerales); el otro 50% se compone de fenoles, principalmente flavonoides. A estos últimos se les atribuyen las propiedades farmacológicas, acompañados de ácidos fenólicos y ésteres, aldehídos, cumarinas, cetonas^{27, 31}.

Esta compleja composición le confiere, al propóleo, la capacidad antibacteriana que posee. Esta es una de las primeras propiedades constatadas en múltiples estudios bacteriológicos realizados *in vivo* e *in vitro* frente a varias cepas bacterianas aerobias y anaerobias. Además, confirma su acción bacteriostática y bactericida⁶. Entre otros aspectos, se ha demostrado que los extractos de propóleos potencian la acción de los antibióticos^{6, 28}.

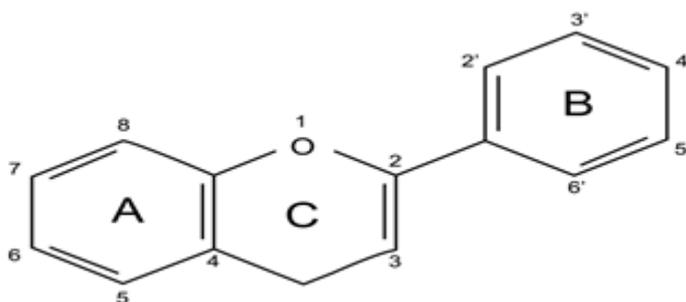


Figura 1. Estructura química básica de los flavonoides³³.

Nota. El esqueleto flavonólico presenta, en su estructura, al menos 3 hidroxilos. Está compuesto por 2 anillos de fenilo (A, B) unidos por un anillo C. Los flavonoides se encuentran en frutas, verduras, semillas y flores. Se ubican principalmente en las hojas de las plantas

Aproximación teórica sobre los mecanismos de resistencia a los antimicrobianos en bacterias

La resistencia a los antimicrobianos se define como la capacidad de los patógenos de resistir la acción de uno o varios antimicrobianos; en consecuencia, dejan de ser efectivos¹⁶. Sin embargo, los microorganismos pueden ser resistentes de forma natural a ciertos antimicrobianos (mecanismo permanente, determinado genéticamente). También, pueden adquirir esa resistencia por mutación o adquisición de genes de resistencia (plásmidos, transposones e integrones)³⁴. En tal sentido, queda claro que las bacterias han desarrollado diversos mecanismos para eludir las principales defensas antibacterianas, siendo los mecanismos de resistencia adquiridos y transmisibles, los de mayor importancia clínica³⁵.

Desde el punto de vista molecular y bioquímico se puede abordar la resistencia natural y adquirida, clasificándolas en tres mecanismos básicos. Los mecanismos de resistencia son: inactivación del antibiótico, alteración del sitio blanco del antibiótico y alteración de las barreras de permeabilidad. Por medio de estos mecanismos las bacterias pueden adquirir resistencia a los antibióticos, impidiéndoles ejercer su mecanismo de acción.

La inactivación del antibiótico por destrucción o modificación de la estructura química, es un proceso molecular que se caracteriza por la producción de enzimas capaces de alterar o destruir la estructura del antibiótico, ocasionando que este pierda su funcionalidad^{34, 35}. Tal es el caso de las β -lactamasas (proteínas capaces de hidrolizar el anillo β -lactámico), eritromicinaesterasa (cataliza la hidrólisis del anillo de lactona del antibiótico). Entre las enzimas que se encargan de alterar o modificar la estructura del antibiótico se encuentran: la cloranfenicol acetiltransferasa, las enzimas modificadoras de los aminoglucósidos, lincosamidas y estreptograminas. El mecanismo de acción de éstas

enzimas se produce a través de reacciones de acetilación, adenilación y fosforilación³⁶.

La resistencia bacteriana causada por la alteración del sitio blanco donde actúa el antibiótico, se basa en la modificación de algunos sitios específicos de esta célula procariota, tales como: la membrana celular, pared celular, ribosomas. Indudablemente, estas modificaciones impiden o dificultan la acción del antibiótico. Entre ellas, las alteraciones a nivel del ADN girasa (mutación de los genes *GyrA* *GyrB*, ofrecen resistencia a las quinolonas), a nivel ribosomal ocurren cambios en las subunidades 30S y 50S, los cuales confieren resistencia a los aminoglucósidos, macrólidos, tetraciclinas y lincosamidas. Entre otras, las alteraciones de las enzimas PBPs (proteínas de unión a la penicilina) necesarias para la formación de la pared celular, alteran su síntesis³⁴. Otro mecanismo de resistencia está representado por la alteración en las barreras de la permeabilidad. Dicha alteración se debe a modificaciones que se dan en los receptores bacterianos específicos para los antimicrobianos, o por alteraciones estructurales en los componentes de la membrana o la pared celular que impiden la llegada del antibiótico al punto diana. En consecuencia, la alteración de la permeabilidad se expresa mediante la pérdida de la capacidad de transporte activo a través de la membrana celular. También, por la expresión de las bombas de eflujo, las cuales se activan en el momento en que el antibiótico entra a la célula bacteriana^{34,36}.

Aproximación teórica sobre los mecanismos de resistencia a meticilina en *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus o estafilococo dorado fue identificado por primera vez por Alexander Ogston, en 1880, como agente causal de diversas lesiones inflamatorias. Este coco grampositivo ha desarrollado una resistencia a los antibióticos a velocidad acrecentada, después de que se introdujera la penicilina, siendo ínfima la proporción de cepas que aún presentan sensibilidad frente a este antibiótico¹⁵. Esta resistencia es

causada, inicialmente, mediante un mecanismo enzimático llevado a cabo por la enzima penicilinasas; la cual hidroliza el anillo β -lactámico de la penicilina. La información genética para su codificación se encuentra en un plásmido transmisible, lo que facilita la rápida diseminación de resistencia entre los estafilococos^{14,15}.

Posteriormente, se incluyeron las penicilinas semi-sintéticas (Meticilina y Oxacilina) para el tratamiento de infecciones por esta bacteria productora de betalactamasas¹⁵. Sin embargo, un grupo de *Staphylococcus aureus* desarrolló un nuevo mecanismo que le confirió la resistencia a la metilina. Este mecanismo consiste en la adquisición de un gen (*mecA*) que codifica una nueva proteína, la cual se une a la penicilina, (PBP2')¹⁴. La metilina, así como otros antibióticos betalactámicos, tiene la capacidad de unirse a las proteínas de unión de la penicilina (enzimas responsables de la construcción de la pared de peptidoglucano) y de esta manera provoca la destrucción de la bacteria. Esta modificación en la estructura de su proteína ligadora o fijadora a la penicilina, impide que la metilina pueda adherirse y ejercer su acción de bloquear la enzima transpeptidasa^{14, 15}.

El mecanismo mediado por el gen *mecA*, además de conferirle resistencia absoluta contra las penicilinas semi-sintéticas y cefalosporinas de primera y segunda generación, hace inútiles a todos los betalactámicos, incluyendo cefalosporinas de tercera y cuarta generación y los carbapenemos. Adicionalmente, esta resistencia se extiende también a otras familias de antibióticos como las quinolonas y lincosamidas, lo que ha ocasionado una decadencia en el arsenal terapéutico de las infecciones producidas por estos cocos grampositivos. Este grupo de *Staphylococcus aureus* resistente a metilina se engloba bajo el acrónimo SARM¹⁵.

Análisis de la actividad antibacteriana del propóleo

El estudio de la actividad antibacteriana del propóleo puede llevarse a cabo mediante una variedad de métodos de determinación de resistencia. Los cuales permiten, observar la respuesta de un microorganismo a una o varias sustancias antimicrobianas. Sin embargo, para efectuar el análisis de la actividad antibacteriana del propóleo es necesario purificar previamente dicha sustancia con solventes de extracción para eliminar el material contaminante, originado por diversos factores³⁷. De esta manera, se obtiene un mejor efecto de las propiedades atribuidas a su composición química.

Obtención del extracto etanólico de Propóleo

El propóleo a causa de su composición química posee una gran variedad de propiedades biológicas y farmacológicas, que ha generado un incremento en el estudio de este producto. Sin embargo, el propóleo no puede ser utilizado como material en bruto, sino que debe ser purificado para eliminar el material no deseado y conservar la fracción activa. Esta técnica se realiza mediante extracción con disolventes en múltiples etapas para obtener el extracto de propóleo rico en componentes fenólicos, sin parafina y otros contaminantes; tomando en cuenta que así se logra un mejor efecto de sus propiedades⁹.

La mayoría de los productos generados del propóleo que se encuentran disponibles comercialmente como cápsulas, tabletas, ampollas y jarabes, se basan en la extracción por etanol. La cual consiste en pesar cierta cantidad de propóleo (esto va a depender de la concentración que se quiera obtener) al que se le adiciona 100 mL de etanol; se deja en reposo por espacio de varios días (generalmente de 8-12) con agitación ocasional y protegido de la luz con una cubierta a temperatura ambiente. Al final del reposo los extractos se filtran y se colocan en alícuotas, manteniéndose refrigerados y protegidos de la luz,

de esta manera se obtienen los extractos etanólicos de propóleos a diferentes concentraciones^{28, 21}.

Procedimientos para analizar la actividad del propóleo

Método de Difusión de Disco en Agar

Esta técnica consiste en la difusión de un antibiótico (sustancia antimicrobiana que se desea estudiar) en un medio de agar solidificado en una placa de Petri. El cual ha sido previamente inoculado con el microorganismo de prueba o modelo bien establecido (cepa ATCC) con una concentración igual a la del estándar 0,5 de Mc Farland; durante un período de incubación de 18 a 24 horas. En este lapso de tiempo el microorganismo es inhibido dentro de la zona de difusión del antibiótico, en un área circular; los halos formados son medidos y analizados de forma estadística para determinar la potencia relativa de la sustancia antimicrobiana^{38, 39}.

Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Esta prueba consiste en determinar la concentración mínima del agente antimicrobiano que es capaz de inhibir completamente la multiplicación del microorganismo. Puede llevarse a cabo a través de distintos métodos: microdilución, microtitulación o difusión del disco en agar. El valor de esta concentración permite analizar la actividad de los antimicrobianos a bajas concentraciones (presenten alta potencialidad biológica) para evitar toxicidad a efectos secundarios. En función a esta concentración se clasifica la sensibilidad de un microorganismo a una sustancia antimicrobiana^{40, 15}.

Lectura del antibiograma con discos impregnados con los extractos de propóleos

Consiste en observar la respuesta del microorganismo probado al ser sometido bajo las condiciones del ensayo a discos impregnados con el extracto etanólico de propóleo. Categorizando dicho resultado como sensible o resistente, variando las concentraciones del extracto⁴¹. De esta manera, considerar las posibilidades de éxito en la obtención de nuevos productos para uso terapéutico de infecciones causadas por este patógeno.

Definición Operacional de Términos

Actividad antibacteriana *in vitro*

La actividad antibacteriana *in vitro* consiste en analizar mediante técnicas de susceptibilidad antimicrobianas (dilución en caldo o difusión en agar, entre otras) la capacidad que posee una sustancia de suprimir el crecimiento y desarrollo de un microorganismo o destruir dichas cepas a bajas concentraciones. Generalmente se analiza en un ambiente controlado o en un tubo de ensayo y fuera de un organismo vivo (*in vitro*), esto debido a que los estudios *in vitro* pueden arrojar resultados poco exactos^{2, 38}.

Actividad Bacteriostática

Se define como el valor de la actividad antimicrobiana que es capaz de inhibir el crecimiento de un microorganismo. Se determina *in vitro* al enfrentar una concentración conocida de microorganismo con una serie de diluciones de antimicrobiano¹⁴.

Actividad Bactericida

Es el valor de la actividad antimicrobiana capaz de destruir un determinado microorganismo. Se determina *in vitro* enfrentando una concentración estándar de un microorganismo con diluciones seriadas de un antimicrobiano¹⁴

Concentración Mínima Bactericida (CMB)

La concentración mínima bactericida evalúa la menor concentración del antimicrobiano estudiado que es capaz de destruir un inóculo de bacterias, después de incubarse por 18-24 horas. Es también denominada concentración mínima letal (CML) debido a que la mínima concentración del agente antibacteriano permite sobrevivir menos del 0,1 % del inóculo inicial⁴⁰.

Operacionalización de las Variables

Para operacionalizar el sistema de variables o el evento de estudio con el respectivo criterio de análisis, es necesario la definición conceptual y la operacional de las mismas⁴². En tal sentido, las variables se operacionalizaron con el fin de identificar elementos y datos empíricos que expresan su presencia. En esta investigación se operacionalizaron las variables cualitativas nominal y ordinal y la variable cuantitativa continua. El nivel de medición fue nominal, ordinal y de razón y los indicadores derivaron de las bases teóricas. El proceso de la operacionalización de las variables se llevó a cabo con la finalidad de que los objetivos propuestos fuesen alcanzados.

Cuadro 1. Operacionalización de la variable actividad antibacteriana *in vitro* de los extractos etanólicos de los propóleos de diferente procedencia.

1.Variable	2.Definición conceptual ¿Qué es?	3.Definición operacional ¿Cómo se mide?
Actividad antibacteriana <i>in vitro</i> de los extractos etanólicos de propóleos	La actividad antibacteriana <i>in vitro</i> consiste en analizar la capacidad que posee una sustancia (extractos etanólicos de propóleos) de suprimir el crecimiento y desarrollo de un microorganismo o destruir dichas cepas a bajas concentraciones. Mediante técnicas de susceptibilidad antimicrobianas ² .	La actividad antibacteriana de los extractos etanólicos de propóleos se puede analizar mediante el método de difusión de disco en agar (método de Kirby-Bauer) en cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina. También, a través de la CMI de las diferentes concentraciones de los extractos mediante diluciones seriadas.
4.Dimensiones	5.Indicador	
<ul style="list-style-type: none"> 1. Sensible. 2. Resistente. 	Tamaño del halo de Inhibición	

Fuente: Jaimes, Jaimes, Hernández y Longa (2019)

Cuadro 2. Operacionalización de la variable procedencia de los extractos etanólicos de los propóleos de diferente procedencia.

1.Variable	2.Definición conceptual ¿Qué es?	4.Definición operacional ¿Cómo se mide?
<p>Procedencia de los extractos etanólicos de los propóleos</p>	<p>La procedencia del propóleo depende del área geográfica donde fue formado, en correspondencia con las plantas y las abejas que participaron en su formación.</p>	<p>La procedencia del propóleo se registra reconociendo el área geográfica de la cual procede. Esto podría influir en la variedad de su composición.</p>
4.Dimensiones	5.Indicador	
<p>Propóleo 1 procedente de Tabay</p> <p>Propóleo 2 procedente de Táchira</p> <p>Propóleo 3 procedente de Mérida</p>	<p>La zona geográfica de procedencia</p>	

Fuente: Jaimes, Jaimes, Hernández y Longa (2019).

Cuadro 3. Operacionalización del criterio de análisis Método de Kirby Bauer para medir la sensibilidad de las cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina.

1.Criterio de análisis	2.Definición conceptual ¿Qué es?	4.Definición operacional ¿Cómo se mide?
Método de Kirby Bauer	Consiste en la difusión de un disco con la sustancia antimicrobiana que se desea evaluar en agar solidificado (Mueller Hinton), previamente inoculado con el microorganismo de prueba con una concentración ajustada al 0,5 de la escala de McFarland ³⁸ .	El método de Kirby Bauer se lleva a cabo inoculando el agar con el microorganismo de prueba con una concentración igual a la del estándar 0,5 de Mc Farland, estriándose en forma paralela y compacta, de tal manera que abarque toda la superficie del agar, repitiendo el proceso rotando la placa 60° en dos oportunidades más, se deja secar por 5 minutos y se procede a colocar los discos. Posteriormente, se incuba a 37 °C por 24 horas, transcurrido ese tiempo se procede a realizar la lectura de la prueba ⁴³ .
4Dimensiones	5.Dimensiones 6.Indicador	
Sensible Resistente	Tamaño del halo de inhibición	

Fuente: Jaimes, Jaimes, Hernández y Longa (2019).

Objetivos de la investigación

Objetivo general

Comparar las diferencias y semejanzas entre la actividad antibacteriana *in vitro* y los extractos etanólicos de 3 tipos de propóleos frente a cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina, en el Laboratorio de Síndromes Gastrointestinales y Urinarios “Lcda. Luisa Vizcaya” de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, desde Junio de 2019 hasta Diciembre de 2022.

Objetivos específicos

- Examinar la actividad antibacteriana *in vitro* de extractos etanólicos de propóleos de diferentes procedencias en correspondencia con el método de Kirby Bauer, en cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina.
- Interpretar la actividad antibacteriana *in vitro* de los extractos etanólicos de propóleos de diferentes procedencias en correspondencia con el tamaño de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano, en cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina.
- Comparar las diferencias y semejanzas entre los halos de inhibición del crecimiento bacteriano y los extractos etanólicos de propóleos de diferentes procedencias, frente a cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina.

www.bdigital.ula.ve

MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo de Investigación

Según Hurtado (2010), toda investigación expresa características esenciales propias, y una manera muy particular de llevar a cabo el proceso. Por lo que cada tipo de investigación abarcará un grado de complejidad y tendrá estrecha relación con el objetivo de la misma⁴². La presente investigación correspondió por su naturaleza con una investigación de tipo comparativa, cuya intención fue comparar las diferencias y semejanzas entre la actividad antibacteriana *in vitro* y los extractos etanólicos de 3 tipos de propóleos frente a cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina.

Diseño de investigación

Según Hurtado (2010), el diseño de investigación se basa en las estrategias utilizados para llevar a cabo la recolección y organización de los datos, de manera que permitan alcanzar el objetivo planteado⁴². En tal sentido, el diseño de investigación permite orientar al investigador sobre que observaciones hacer, en qué momento del tiempo hacerlas y cuántos eventos observar. Al respecto, el diseño de investigación debe precisar criterios comunes tales como: cuándo, dónde, cuánto. El diseño de esta investigación de acuerdo con el origen de la información fue de laboratorio debido a que los datos se recolectaron en un ambiente artificial, creado: en el Laboratorio de Síndromes Gastrointestinales y Urinarios “Lcda. Luisa Vizcaya”. Con respecto a la temporalidad en la que se obtuvieron los datos, esta investigación tuvo un diseño contemporáneo, transeccional, porque los datos fueron recolectados en el presente y en un solo momento del tiempo. Además, tuvo un diseño no experimental porque no se manipularon y controlaron las variables. Por lo tanto, el presente estudio tuvo un diseño contemporáneo, de laboratorio, no experimental, transeccional y unieventual.

Población y muestra

Unidad de Investigación

En toda investigación es necesario determinar el universo donde se llevará a cabo la investigación, así como el contexto al cual se dirigirá la atención del investigador. Se plantea entonces que una población es un conjunto de elementos conocidos o desconocidos con características comunes denominadas criterios de inclusión, para los cuales serán extensivas las conclusiones del estudio. De tal manera, el conjunto representativo y finito que se extrae de la población accesible es lo que se considera como muestra⁴². La unidad de investigación del presente

estudio se tipificó como finita y accesible, ya que estuvo representada por cepas aisladas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina procedentes de varios Laboratorios clínicos y dos cepas de referencia internacional conservadas en el Laboratorio de Síndromes Gastrointestinales y Urinarios “Lcda. Luisa Vizcaya” de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes.

Selección del tamaño de la muestra

Según Hurtado (2010), determinar el tamaño de la muestra es un aspecto importante, se debe seleccionar de tal manera que las características de la misma sean representativas, con respecto al resto de la población⁴². En este estudio la “n” muestral estuvo representada por 23 cepas aisladas de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina. Además, se incluyeron: 1 cepa ATCC de *Escherichia coli* como control negativo y 1 cepa de *Staphylococcus aureus* como control positivo.

www.bdigital.ula.ve

Sistema de variables

Las variables que guardan relación con el objetivo planteado en esta investigación, y a su vez, permitieron corroborar la relación del fenómeno de estudio en la unidad de investigación, fueron las siguientes: actividad antibacteriana *in vitro* con sus 2 categorías (sensible resistente), procedencia de los extractos etanólicos de propóleos con sus 3 categorías (Tabay, Rubio, Mérida). Estas variables no fueron sistematizadas porque esta investigación no fue confirmatoria.

Procedimientos de la investigación

Obtención de los extractos etanólicos de propóleos

Las tres muestras de propóleos utilizadas en el presente estudio se encontraban almacenadas a temperatura ambiente y protegidas de la luz con papel aluminio en el Laboratorio de Síndromes Gastrointestinales y Urinarios "Lcda. Luisa Vizcaya" de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes. Estas fueron preparadas utilizando etanol al 97% mediante maceración en frío de acuerdo a la metodología descrita por Andrade (2012). Se utilizó una proporción 3:10 de propóleo bruto y etanol, con una variación en la pureza del etanol.

De acuerdo al registro de procedencia de dichas muestras, se pudo conocer que todas eran originarias de la región andina del país. La muestra uno fue recolectada en la población de Tabay estado Mérida, Venezuela mediante el método de raspado con espátula metálica. La recolección de la segunda muestra se realizó en una localidad de Rubio estado Táchira. Mientras que la tercera muestra se obtuvo en un puesto de ventas de productos apícolas en la ciudad de Mérida.

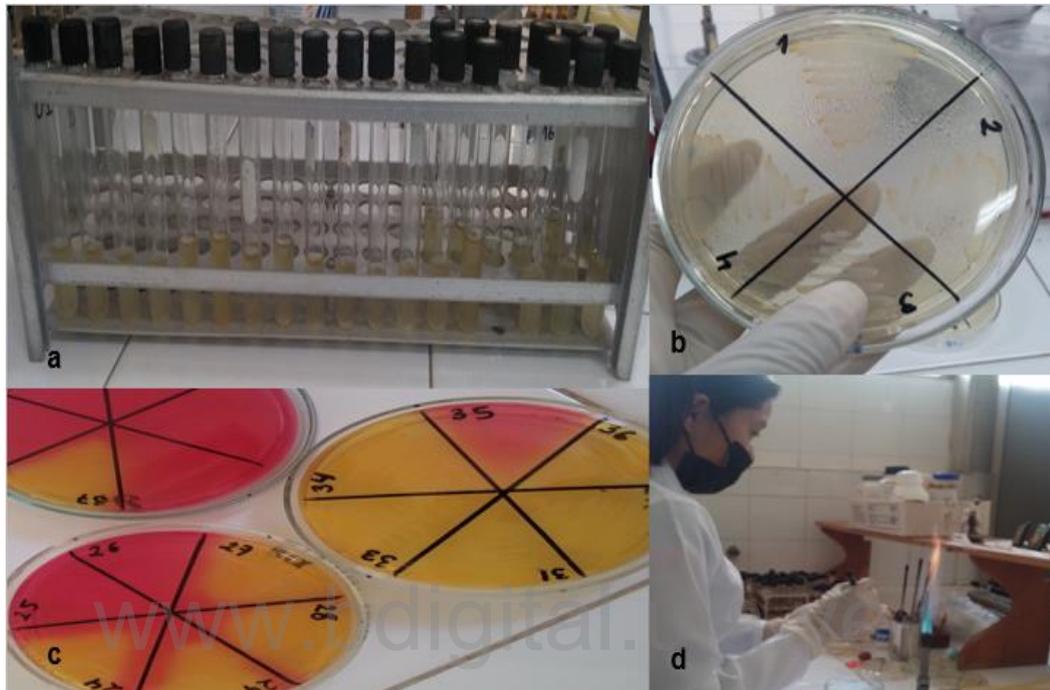
Reactivación de las cepas de referencia internacional (ATCC)

Las cepas ATCC de *Escherichia coli* y ATCC de *S. aureus* resistente a la meticilina fueron reactivadas en caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI) a 37 °C por 24 horas. Posteriormente, se cultivaron en agar Trypticase Soya al 3% en iguales condiciones de incubación, con el fin de verificar la pureza. Luego se realizaron las pruebas bioquímicas pertinentes para las diferentes cepas.

Reactivación de los aislados de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina

Las cepas de SARM se reactivaron en caldo Infusión Cerebro Corazón (BHI) a 37 °C por 24 horas. Posteriormente, se cultivaron en Agar Nutriente en iguales condiciones de incubación, a fin de verificar la pureza. Luego se realizaron las pruebas clave para corroborar el género y

la especie. Posteriormente, se analizó la resistencia a la meticilina de dichas cepas, mediante una prueba en agar Müller-Hinton, en la cual se colocó un disco de Cefoxitin para confirmar la resistencia de las cepas en estudio.



a. Reactivación de las cepas SARM en caldo BHI. **b.** Cepas SARM en Agar Nutriente. **c.** Fermentación del manitol. **d.** Prueba de resistencia al cefoxitin en agar Müller-Hinton.

Figura 2. Reactivación de los aislados de *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina.

Preparación de los discos

Los discos de 6mm de diámetro fueron elaborados con papel de filtro, los cuales se impregnaron con 20 μ L de cada solución de los extractos preparados anteriormente. También se prepararon discos con Metanol como controles negativos. Todos los discos fueron esterilizados bajo la luz ultravioleta, durante 24 horas, en el Laboratorio de Síndromes Gastrointestinales y Urinarios “Lcda. Luisa Vizcaya” de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes.

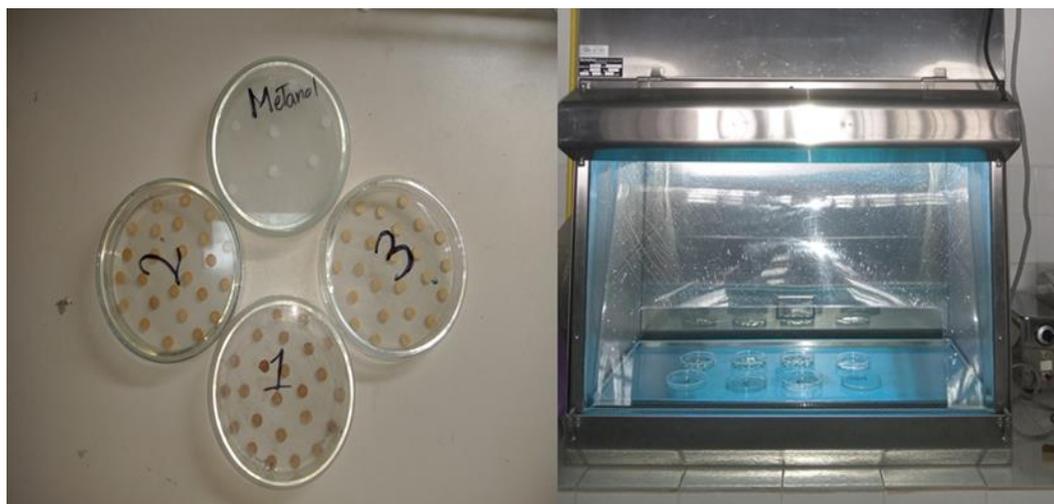


Figura 3. Preparación de los discos impregnados con los extractos de propóleo y etanol 97%.

Preparación del inóculo

Para la preparación del inóculo se tomaron 3 colonias a partir de un cultivo fresco de cada cepa bacteriana. Estas colonias fueron inoculadas en solución salina estéril (0,85% NaCl). Luego se estandarizó la densidad del inóculo en correspondencia con 0,5 del patrón de Mc Farland.

Análisis de la actividad antibacteriana

El estudio de la actividad antibacteriana de los extractos etanólicos de propóleo se llevó a cabo empleando el método de difusión de disco en agar (Kirby-Bauer), según la metodología descrita por Velazco (2005). Las cepas de estudio fueron: aislados de *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina, una cepa ATCC de *Escherichia coli* (control negativo) y una cepa ATCC de *S. aureus* (control positivo). Esta prueba fue realizada en el Laboratorio de Síndromes Gastrointestinales y Urinarios "Lcda. Luisa Vizcaya" de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes.

Se utilizó un hisopo estéril, el cual se sumergió en el inóculo estandarizado en correspondencia con 0,5 de la escala de Mc Farland. Luego se estrió la placa de agar Müeller Hinton en forma paralela y compacta, abarcando toda la superficie. Se repitió el proceso rotando la placa a 60° dos veces. Posteriormente, se dejó secar durante 15 minutos antes de colocar los discos impregnados con el extracto de propóleo. Seguidamente se colocaron los discos con una pinza anatómica estéril presionando suavemente sobre el agar para permitir su adherencia, tanto los impregnados con el extracto de propóleo como los preparados con metanol (control negativo). En cada placa inoculada con la cepa de estudio y control (positivo y negativo) se colocaron los discos con los 3 tipos de propóleo y metanol. Seguidamente, se incubaron a 37 °C por un lapso de 18-24 horas.

Lectura interpretada del antibiograma

La lectura del antibiograma se realizó después del tiempo de incubación previsto. El indicador clave fue el halo de inhibición. Por eso, se consideró medir la ausencia o presencia de dicho halo a través de una regla milimetrada. Se determinaron dos posibles resultados: (1) presencia del halo de inhibición con el tamaño respectivo en milímetros; interpretado como sensible, (2) ausencia del halo de inhibición, leído como resistente. No se consideró punto de corte estandarizado porque no está normado por el Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI).

Diseño de Análisis de los Datos

El diseño de análisis se debe seleccionar a partir del objetivo de la investigación y el diseño de la misma, con el fin de generar el conocimiento nuevo que permita alcanzar el logro propuesto por el investigador⁴². Los resultados obtenidos en esta investigación fueron analizados mediante un enfoque cuantitativo. Las características que se

midieron tuvieron como punto de partida su naturaleza cualitativa. Los datos recolectados fueron interpretados mediante técnicas estadísticas utilizando el programa SPSS, con el fin de confirmar la relación causa-efecto del problema planteado.

La recolección de los datos se hizo durante la fase interactiva de la investigación. El análisis de los mismos fue realizado a través de un enfoque cuantitativo, utilizando operaciones matemáticas (Pallella y Martins, 2011). El universo estadístico de este estudio estuvo representado por todas las cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina aisladas en la ciudad de Mérida, en las cuales estaba la característica en estudio: actividad antibacteriana. A su vez, la población estadística estuvo representada por el conjunto de valores de la característica en estudio. La muestra fue representada por el subconjunto de valores de la actividad antibacteriana, cuyo indicador fue el halo de inhibición.

Las variables, características en estudio, que se midieron tuvieron como punto de partida su naturaleza cualitativa y cuantitativa. En consecuencia, tuvieron una escala de medida nominal, ordinal y razón, respectivamente. Los valores o datos fueron analizados a través del diseño univariable, bicategorico y multicategorico, a través del sistema SPSS (*Statistical Package for the Social Science* versión 21.0). El análisis estadístico se realizó en 1 fase: descriptiva: frecuencias simples y porcentuales.

Variables estadísticas

Las variables estadísticas de esta investigación fueron clasificadas desde su naturaleza y escala de medida. El fin fue identificar el indicador estadístico pertinente (Cuadro N° 4). Entre otros aspectos, estos indicadores permitieron la interpretación de los resultados.

Cuadro N° 4. Variables estadísticas según la naturaleza, escala de medida e indicadores estadísticos.

Variables	Tipo de variable			Escala de medida				Indicador estadístico
	Cualitativa	Cuantitativa		Nominal	Ordinal	Intervalo	Razón	
		Discreta	Continua					
Actividad antibacteriana -Presente -Ausente	Si	No	No	Si	No	No	No	Frecuencias absolutas, %
Actividad antibacteriana -Sensible -Resistente	Si	No	No	No	Si	No	No	Frecuencias absolutas, %
Tamaño del halo de inhibición	No	No	Si	No	No	No	Si	Frecuencias absolutas, % Medidas de posición, gráficos caja y bigote, tallo y hoja
Tipo de propóleo según procedencia	Si	No	No	No	Si	No	No	Frecuencias absolutas, %

Sistematización de los resultados

Los resultados fueron sistematizados a través de tablas, El fin de esta sistematización fue contribuir con la interpretación de los resultados. De esta manera, se contribuyó con la respuesta al enunciado holopráxico. A su vez, se obtuvo el conocimiento nuevo formulado en el objetivo general y sistematizado a través de los sublogros presentes en los objetivos específicos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Resultados

En el presente estudio se analizaron 23 aislados clínicos de *Staphylococcus aureus* meticilino resistentes (SARM) procedentes de varios laboratorios clínicos de la ciudad de Mérida. Además, se analizaron 2 cepas ATCC: una cepa de *Staphylococcus aureus* sensible a meticilina (control positivo) y una de *Escherichia coli* (control negativo). El procesamiento y análisis de las cepas se realizó en el Laboratorio de Síndromes Gastrointestinales y Urinarios “Lcda. Luisa Vizcaya” de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes.

**Distribución de la muestra poblacional según las variables:
crecimiento de las cepas en medio nutritivo, forma de la colonia,
color de la colonia, consistencia de la colonia y elevación de la
colonia**

Se analizaron las variables fenotípicas relacionadas con el crecimiento en el medio nutritivo, forma de la colonia, color de la colonia, consistencia de la colonia y elevación de la colonia. El crecimiento en el medio nutritivo presentó 3 categorías con las respectivas frecuencias absolutas y porcentuales: escaso (3/13.04%), moderado (5/21.74%), abundante (15/65.22%). La forma de la colonia presentó 2 categorías: puntiforme (5/21.74%) y circular (18/78.26%). Respecto al color de las colonias, esta variable presentó 4 categorías: amarillo (5/21.74%), amarillo-naranja (2/8.70%), blanco (7/30.43%) y blanco hueso (9/39.13%). En cuanto a la consistencia de la colonia, se presentaron 2 categorías: viscosa (7/30.43%), cremosa (16/69.57%). La elevación de las colonias presentó 2 categorías: ligeramente convexa (14/60.87%) y lisa (9/39.13%) (Tabla 1).

Distribución de la muestra poblacional según las pruebas clave: prueba de la catalasa y coagulasa

Se analizó la correspondencia de las cepas de estudio con la prueba clave de la catalasa. Al respecto, se consideraron las siguientes categorías: (1) catalasa positivo, (2) catalasa negativo. Así mismo, se analizó la correspondencia de las cepas de estudio con la prueba clave de la coagulasa. Al respecto, se consideraron las siguientes categorías: (1) coagulasa positivo, (2) coagulasa negativo. Todas las cepas fueron catalasa y coagulasa positiva (Tabla 2).

Distribución de la muestra poblacional según la fermentación del manitol

Se analizó la correspondencia de las cepas en estudio con la fermentación del manitol. Al respecto, se consideraron las siguientes categorías: (1) cepas manitol positivo, (2) cepas manitol negativo. Todas las cepas fueron manitol positivo (Tabla 3).

Distribución de la muestra poblacional según la prueba de susceptibilidad a la meticilina

Se analizó la susceptibilidad a la meticilina. Al respecto, se consideraron las siguientes categorías: sensible y resistente. Todas las cepas fueron resistentes a la meticilina (Tabla 4).

Susceptibilidad *in vitro* de los extractos etanólicos de propóleos en cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina

Se analizó la susceptibilidad de 3 muestras de propóleos según la procedencia (P1/Tabay, P2/Táchira, P3/Mérida) en cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina. Para el patrón de susceptibilidad se consideraron las siguientes categorías: sensible y resistente. Todas las cepas fueron resistentes a las 3 muestras de propóleos. El control positivo solo fue sensible al propóleo 3 y el control

negativo fue resistente a las 3 muestras de propóleos (Tabla 5 y 6, Figura 3).

Tabla 1. Distribución de la muestra poblacional según las variables: crecimiento de las cepas en el medio nutritivo, forma de la colonia, color de la colonia, consistencia de la colonia y elevación de la colonia.

Fenotipos de las colonias		Características Fenotípicas de las colonias	
		N°	%
Crecimiento de la colonia	Escaso	3	13.04
	Moderado	5	21.74
	Abundante	15	65.22
	Total	23	100
Forma de la colonia	Puntiforme	5	21.74
	Circular	18	78.26
	Total	23	100
Color de la colonia	Amarillo	5	21.74
	Amarillo-naranja	2	8.70
	Blanco	7	30.43
	Blanco hueso	9	39.13
Consistencia de la colonia	Total	23	100
	Viscosa	7	30.43
	Cremosa	16	69.57
Elevación de la colonia	Total	23	100
	Ligeramente convexa	14	60.87
	Lisa	9	39.13

Nota. Entre las cepas reactivadas se observó la variedad de fenotipos de las colonias que crecieron en el agar nutritivo. La mayoría de las cepas mostraron buen crecimiento. Sin embargo, llama la atención que 13,04 % de las cepas mostraron crecimiento escaso. Probablemente son cepas disgónicas que requieren mayor tiempo de incubación para crecer (48 horas), generalmente son más pequeñas y se asocian a mutaciones de la cadena respiratoria. También, se asocian a osteomielitis crónica. (Cervantes *et al.*)⁴⁴.

Tabla 2. Distribución de la muestra poblacional según las pruebas clave: catalasa y coagulasa.

Cepas	Pruebas			
	Catalasa		Coagulasa	
	Positiva	Negativa	Positiva	Negativa
S01	1	-	1	-
S02	1	-	1	-
S03	1	-	1	-
S04	1	-	1	-
S05	1	-	1	-
S06	1	-	1	-
S07	1	-	1	-
S08	1	-	1	-
S09	1	-	1	-
S10	1	-	1	-
S11	1	-	1	-
S12	1	-	1	-
S13	1	-	1	-
S14	1	-	1	-
S15	1	-	1	-
S16	1	-	1	-
S17	1	-	1	-
S18	1	-	1	-
S19	1	-	1	-
S20	1	-	1	-
S21	1	-	1	-
S22	1	-	1	-
S23	1	-	1	-
Total	23	0	23	0
Porcentaje	100,00	0,00	100,00	0,00

Nota. Entre las cepas reactivadas se observó que todas fueron catalasa positiva, lo cual indicó que convierten el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. También fueron coagulasa positiva, lo cual indicó que las cepas producen la enzima extracelular que coagula al plasma. Esta prueba es muy sensible y específica para identificar cepas de *Staphylococcus aureus* (Zandejas et al.)⁴⁵.

Tabla 3. Distribución de la muestra poblacional según la fermentación del manitol.

Cepas	Fermentación del manitol	
	Positivo	Negativo
S01	1	-
S02	1	-
S03	1	-
S04	1	-
S05	1	-
S06	1	-
S07	1	-
S08	1	-
S09	1	-
S10	1	-
S11	1	-
S12	1	-
S13	1	-
S14	1	-
S15	1	-
S16	1	-
S17	1	-
S18	1	-
S19	1	-
S20	1	-
S21	1	-
S22	1	-
S23	1	-
Total	23	0
Porcentaje	100,00	0,00

Nota. Entre las cepas reactivadas se observó que todas fermentaron el manitol. El agar manitol salado es un medio selectivo para de *Staphylococcus* patógenos, debido a la concentración de NaCl (7,5%), sobretodo *Staphylococcus aureus*. Este coco grampositivo produce ácido en este medio, reaccionando con el indicador rojo fenol, el cual en pH ácido cambia a color amarillo. Por eso, la colonias de *Staphylococcus* patógenos evidencian color amarillo a su alrededor (Duran *et al.*)⁴⁶. En las cepas estudiadas este fenotipo estuvo presente.

Tabla 4. Distribución de la muestra poblacional según la prueba de susceptibilidad a la meticilina.

Cepa	Susceptibilidad a meticilina	
	Sensible	Resistente
S01	No	Si
S02	No	Si
S03	No	Si
S04	No	Si
S05	No	Si
S06	No	Si
S07	No	Si
S08	No	Si
S09	No	Si
S10	No	Si
S11	No	Si
S12	No	Si
S13	No	Si
S14	No	Si
S15	No	Si
S16	No	Si
S17	No	Si
S18	No	Si
S19	No	Si
S20	No	Si
S21	No	Si
S22	No	Si
S23	No	Si

Nota. Entre las cepas reactivadas se observó que todas fueron resistentes a la meticilina, lo cual revela que son cepas resistentes a todos los B-lactámicos incluyendo cefalosporinas y carbapenem (Echavarría *et al.*)⁴⁷. Por lo tanto, estas cepas poseen PBP2a codificada por el gen *mecA* presente en una isla genómica de este coco grampositivo (Perozo *et al.*, Ruiz *et al.*)^{48, 49}. En este estudio se realizó una lectura interpretada del antibiograma utilizando un antibiótico marcador (Cefoxitin) para detectar las cepas resistentes a la meticilina. Es importante resaltar que el disco de Cefoxitin es un marcador sensible para la susceptibilidad a la oxacilina y meticilina; además no es afectado por la hiperproducción de penicilinasas, la cual podría disminuir los halos de inhibición, dando un falso negativo.

Tabla 5. Susceptibilidad *in vitro* de los extractos etanólicos de propóleos en cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina.

Cepas	Extractos etanólicos de Propóleos [§]			Metanol (control negativo)
	P1	P2	P3	
S1	R	R	R	R
S2	R	R	R	R
S3	R	R	R	R
S4	R	R	R	R
S5	R	R	R	R
S6	R	R	R	R
S7	R	R	R	R
S8	R	R	R	R
S9	R	R	R	R
S10	R	R	R	R
S11	R	R	R	R
S12	R	R	R	R
S13	R	R	R	R
S14	R	R	R	R
S15	R	R	R	R
S16	R	R	R	R
S17	R	R	R	R
S18	R	R	R	R
S19	R	R	R	R
S20	R	R	R	R
S21	R	R	R	R
S22	R	R	R	R
S23	R	R	R	R

§P1: Extracto etanólico de propóleo (Tabay). **P2:** Extracto etanólico de propóleo (Táchira). **P3:** Extracto etanólico de propóleo (Mérida). **R:** Resistente. **S:** Sensible

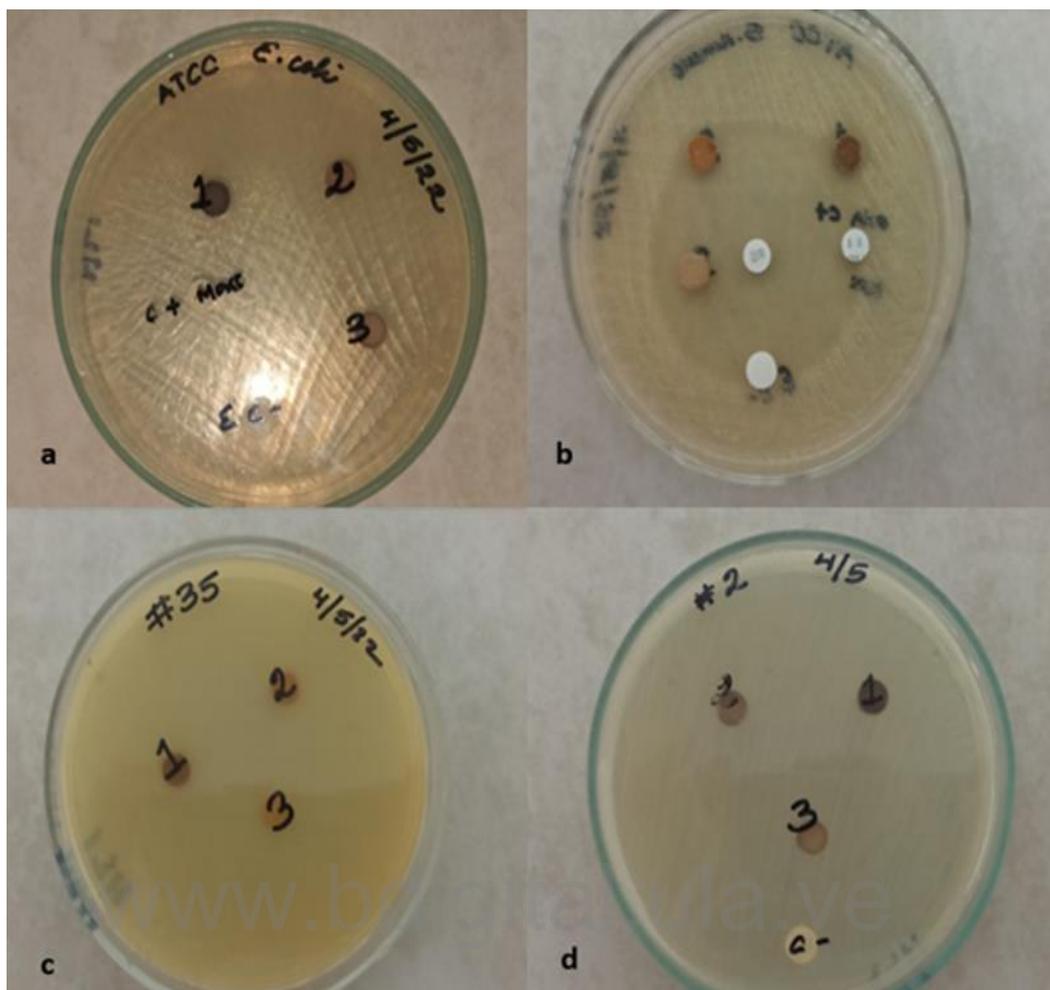
Nota. Entre las cepas reactivadas se observó que todas fueron resistentes a los 3 tipos de propóleo. También, mostraron resistencia al metanol (control negativo).

Tabla 6. Susceptibilidad *in vitro* de los extractos etanólicos de propóleos en cepas ATCC: *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

Cepas	Extractos etanólicos de Propóleos [§]			Metanol (control negativo)
	P1	P2	P3	
ATCC <i>Staphylococcus aureus</i> (control positivo)	R	R	S	R
ATCC <i>Escherichia coli</i> (control negativo)	R	R	R	R

§P1: Extracto etanólico de propóleo (Tabay). **P2:** Extracto etanólico de propóleo (Táchira). **P3:** Extracto etanólico de propóleo (Mérida). **R:** Resistente. **S:** Sensible

Nota. Respecto a las cepas ATCC, el bacilo gramnegativo no mostró sensibilidad a los tipos de propóleo. Mientras que el coco grampositivo mostró sensibilidad al propóleo 3, procedente de Mérida.



- a. Cepa ATCC 25922 de *Escherichia coli* (control negativo). b. Cepa ATCC 25923 de *Staphylococcus aureus* utilizada (control positivo). c-d. Aislados clínicos de SARM.

Figura 4. Actividad antibacteriana de los extractos etanólicos de propóleos frente a las cepas ATCC y aislados clínicos *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina.

Discusión

En el presente estudio se pretendió comparar las diferencias y semejanzas entre la actividad antibacteriana *in vitro* y los extractos etanólicos de tres tipos de propóleos de la especie *Apis mellifera*, pertenecientes a la región de los Andes venezolanos (Tabay, Táchira, Mérida) frente a cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina. La actividad antibacteriana de los extractos se probó mediante el método de difusión del disco contra 23 aislados clínicos de SARM recolectados en la ciudad de Mérida. Al realizar el enfrentamiento contra dichas cepas, los resultados revelaron que las cepas estudiadas no presentaron sensibilidad ante ninguno de los extractos ensayados por este método. Por lo tanto, no hubo diferencias entre la actividad antibacteriana de los tres tipos de propóleos ante dichos microorganismos, pues en el antibiograma no se observó halo de inhibición para ninguno de ellos.

De acuerdo a los resultados, se deduce que, probablemente, las sustancias con actividad antibacteriana se encuentran en bajas concentraciones en los extractos etanólicos de propóleos utilizados en este estudio. Por esta razón, se puede inferir que no poseen actividad antibacteriana sobre los aislados clínicos de *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina, según el método utilizado en esta investigación.

Este hallazgo difiere de lo reportado por otros autores, quienes encontraron que los extractos etanólicos de propóleos tienen acción ante esta bacteria. Tal es el caso de Sanpa *et al.* (2017), quienes obtuvieron resultados positivos al realizar un estudio con 5 muestras de propóleos tailandeses de la misma especie de abejas. Estos autores observaron su actividad frente a 10 microorganismos de prueba; entre ellos, una cepa SARM DMST 20625. A su vez, encontraron concentraciones inhibitorias mínimas (CMI) y concentraciones bactericidas mínimas (CMB) en un rango de 0,06 a 32 mg/mL y 0,25 a 128 mg/mL, respectivamente. En tal sentido, encontraron que todas las muestras de los extractos de

propóleos tailandeses presentaron actividad antibacteriana significativa frente a las bacterias estudiadas.

Asimismo, en otro estudio realizado por Fuentes *et al.* (2021), también reportaron la presencia de actividad antimicrobiana de un extracto etanólico de propóleos cubano (propol-5), frente a cepas de referencia y aislados clínicos, entre los cuales destacan siete muestras de *S. aureus* resistentes a meticilina. Los resultados de esa investigación difieren, también, con los obtenidos en este estudio, ya que evidenciaron actividad antibacteriana en los siete aislados de SARM, demostrando así la efectividad del propóleo ante este microorganismo.

Cabe considerar que las muestras utilizadas en estos ensayos tienen orígenes distintos a los utilizados por los autores de esta investigación. Por lo tanto, de acuerdo a lo descrito por diversos investigadores las diferencias presentadas en la actividad antibacteriana ejercida por dichos extractos, se presume, puede deberse a que existe una variación en su composición química, lo que resulta relevante para una acción efectiva, así lo plantean Samara *et al.* (2011). Estas diferencias en la composición de los propóleos pueden estar determinadas por la variedad de la flora predominante, existente en cada zona biogeográfica de donde las abejas recolectan la materia prima para producir los propóleos. En tal sentido, factores como el clima, la época de cosecha y el origen geográfico, también afectan dicha composición, así lo refirieron Fuentes *et al.* (2021). Por esta razón, es necesario identificar los compuestos químicos responsables de la actividad antibacteriana del propóleos de cada zona. Sin embargo, en este estudio no se realizaron las pruebas respectivas para su identificación, ya que no formó parte del objeto de estudio.

Otra posible explicación corresponde a los diferentes métodos utilizados en los trabajos antes mencionados, los cuales difieren del utilizado en esta investigación y que podría influir en la variabilidad de los resultados. Al respecto, Carrillo *et al.* (2010) refieren que la técnica más confiable para determinar las propiedades antimicrobianas de una sustancia es la CIM en tubo (dilución en caldo), puesto que ésta es

considerada como una prueba más sensible para probar la sensibilidad de una bacteria frente a un antibacteriano.

No obstante, en otro estudio publicado por Grajales *et al.* (2021) utilizaron nueve extractos de propóleos de abejas sin aguijón de diferentes orígenes, con una concentración del 20% en acción individual y combinado con ajo (*Allium sativum*). Los resultados revelaron actividad antibacteriana solo en cuatro de los nueve extractos de propóleos utilizados tanto individualmente como en forma combinada. Destacando que la composición química de cada propóleo le confiere características específicas a cada uno, validando lo expuesto por otros autores en cuanto a la influencia de la variabilidad en la composición química con respecto a las propiedades antimicrobianas de los propóleos, además de lo expuesto anteriormente.

Por otra parte, en esta investigación se probó la actividad antibacteriana de los tres extractos etanólicos de propóleos en dos cepas control (*Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923), en las cuales se observó que el bacilo gramnegativo no mostró susceptibilidad ante ninguno de los extractos probados. Esta evidencia puede relacionarse con los compuestos anfipáticos que operan como bombas de expulsión de una gran variedad de sustancias presentes en bacterias gramnegativas, así lo expresaron Carrillo *et al.* (2010). Sin embargo, *S. aureus* mostró halo de inhibición frente a la muestra de propóleo 3 procedente de Mérida, corroborando lo descrito por diversos autores que afirman la actividad antibacteriana de los extractos etanólicos de propóleos frente a este coco grampositivo.

En el mismo orden de ideas, Fernández *et al.* (2021) compararon los halos de inhibición de ocho antibióticos y cuatro concentraciones de propóleos en ensayo *in vitro* frente a un aislado clínico de *Staphylococcus aureus*. Estos autores observaron actividad antimicrobiana de siete de los ocho antibióticos utilizados (amikacina, cloranfenicol, tetraciclina, penicilina, doxiciclina, ciprofloxacina y cotrimoxazol). Asimismo, las cuatro

diluciones de propóleos causaron halos de inhibición del crecimiento de este microorganismo similares a los producidos por los antibióticos.

En resumen, en esta investigación no se encontraron diferencias entre la actividad antibacteriana *in vitro* y los extractos etanólicos de los 3 tipos de propóleos frente a las cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina, puesto que en el antibiograma no se observó halo de inhibición en ninguna de las cepas SARM de las unidades de análisis. Finalmente, es importante considerar la dificultad existente al comparar los resultados de diferentes estudios, debido a las distintas composiciones que presentan los propóleos y a un gran número de factores de correlación que podrían influir. Además, podrían influir los métodos utilizados para el análisis de la actividad antibacteriana. En este sentido, es conveniente realizar otras investigaciones en las cuales se consideren diferentes variables, tales como: la composición química y la bioactividad de los extractos de propóleos por zonas geográficas, así como los métodos utilizados para analizar la actividad antibacteriana de tales extractos, con el fin de obtener un conocimiento más amplio con respecto a este problema de investigación.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

Las conclusiones son las respuestas al enunciado holopráxico y a las preguntas formuladas antes de cada objetivo específico. Al respecto, las conclusiones son:

1. No se encontraron diferencias entre la actividad antibacteriana *in vitro* y los extractos etanólicos de los 3 tipos de propóleos frente a cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina, ya que en el antibiograma no se observó halo de inhibición en ninguna de las cepas SARM. Sin embargo, la semejanza entre todas las cepas frente a los tipos de propóleo fue que en ninguna de ellas inhibió su crecimiento.
2. Se observó correspondencia entre la actividad antibacteriana *in vitro* de extractos etanólicos de los 3 tipos propóleos de diferente procedencia con el método de Kirby Bauer, en cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina. Pues, este método reveló ausencia de inhibición del crecimiento de todas las cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina frente a los tipos de propóleo.
3. La lectura del antibiograma reveló la ausencia de los halos de inhibición del crecimiento de las cepas SARM. Por lo tanto, todas las cepas SARM fueron resistentes a los extractos de los propóleos de diferente procedencia.

Recomendaciones

Las recomendaciones derivan de las limitaciones identificadas durante las fases operativas de la investigación. Al respecto, se presentan las siguientes recomendaciones:

1. Ante las situaciones de emergencia, como la pandemia Covid-19 o de otra índole, es conveniente considerar estrategias que permitan mantener activo el proceso de la investigación. Aunque sea con un mínimo rendimiento, para evitar que la dinámica de la investigación se altere con consecuencias negativas.
2. Prever desde la fase de proyecto la búsqueda continua de trabajos previos que aseguren la disposición de los respaldos de la investigación; aun cuando se retrasen en el tiempo, por motivos justificados, las fases indagatorias. De esta manera, se evitaría el vencimiento de los trabajos previos.
3. Mejorar el análisis metodológico de la literatura pertinente con la investigación, con el fin de identificar los diferentes procedimientos utilizados por otros autores. Estos podrían servir para afrontar positivamente alguna limitación relacionada con los procedimientos.
4. Es conveniente hacer un estudio piloto, sobre todo cuando se utilicen extractos que tengan más de un año de obtención.
5. En el caso de la actividad antimicrobiana de un extracto es conveniente respaldar el ensayo de laboratorio con los antibióticos estandarizados, los cuales tienen punto de corte establecido.
6. Entre otros aspectos, es conveniente conocer la composición química de un extracto, al menos realizando pruebas cualitativas. Esto verificaría que el extracto tiene principios que aseguren su bioactividad.
7. Comparar las diferentes muestras de propóleos mediante el tamizaje fitoquímico, con el fin de conocer los compuestos con mayor prevalencia

en su composición química. De esta manera, también se podrían establecer las semejanzas y diferencias entre varias muestras de propóleo: en cuanto a la composición química y la bioactividad respectiva, sobretodo la actividad antimicrobiana.

8. Es conveniente evitar el fomento de la literatura gris; por eso, este trabajo conviene sea divulgado en una revista de publicación primaria.

9. Fomentar un foro de discusión entre varios expertos con el fin de discutir y argumentar los hallazgos obtenidos en esta investigación; específicamente, para identificar las probables variables que impidieron la actividad antibacteriana de los propóleos utilizados.

www.bdigital.ula.ve

REFERENCIAS BIBLIOHEMEROGRÁFICAS

1. García B, Silva G. Manual del técnico superior de laboratorio de análisis clínico. P. e. España: Editorial Mad, S.L; 2004
2. Murray R, Rosenthal S, Pfaller A. Microbiología Médica. 6^{ta} ed. España: Elsevier España, S. L; 2009.
3. Del Rio Martinez P. Actividad Biocida de un *Propolis* Chileno frente a *Porphyromonas gingivalis*. : Estudio in vitro. [MS. C. Cirujano dentista]. Santiago de Chile (Chile), Universidad de Chile. Facultad de Odontología, 2006, 120 Disponible en: http://www.cybertesis.cl/tesis/uchile/2006/delrio_p/sources/delrio_p.pdf
4. Bankova V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Ethnopharmacol.* 2005; 100: 114 – 117. doi: 10.1016/j.jep.2005.05.004.
5. Chaillou L, Herrera H, Maidana J. Estudio de propóleo de Santiago del Estero Argentina. *Cienc. Technol. Aliment.* 2004; 24 (1): 11 – 15. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612004000100003>
6. MC. Marcucci. Propolis chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie Springer Verlac*, 1995; 26 (2): 83 – 99. [hal-00891249](#)
7. Principal J, Barrios C, Pacheco N, et al. Actividad antibacteriana *in vitro* de extracto etanólico de propóleo sobre una cepa clínica de *Staphylococcus aureus*. *Gaceta de ciencias veterinarias.* 2005; 11 (1): 31 – 36. <http://www.ucla.edu.ve/dveterin/departamentos/CienciasBasicas/gc/v/2530int2530er2530no/articulos/documasp/~keh3d2oa.pdf>
8. Furani C. *Análise de própolis da Serra da Japi, determinacao em procesos de cicatrizacao.* [Ms. C. Ciencias Farmacéuticas]. Sao Pablo (Brasil). Universidad de Sao Pablo, facultad de ciencias farmacéuticas, 2005, 138 DOI: 10.11606/D.9.2005.tde-08122008-143118

9. Xu Y., Luo L., Chen B. et al. Recent development of chemical components in propolis. *Front. Biol. China*. 2009; 4(4): 385-391
DOI: 10.1007/s11515-009-0053-2
10. Ávalos A., Pérez E. Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (biología). Serie fisiología vegetal*. 2009; 2(3): 119-145 ISSN: 1989-3620
<http://darwin.bio.ucm.es/revistas/index.php/reduca-biologia/issue/archive>
11. Naivy A., Jiménez E. Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo *in vitro*. *Bioteología Vegetal*. 2011; 11(4): 195-211 ISSN 2074-8647
<https://revista.ibp.co.cu/index.php/BV/article/view/255/837>
12. Waksmundzka M, Sherma J, Kowalska T. (editors). Thin layer chromatography in phytochemistry. Boca Ratón. Taylor & Francis Group. 2008 <https://doi.org/10.1201/9781420046786>
13. Russo A., Troncoso N., Sanchez F., et al. Chilean propolis: antioxidant activity and antiproliferative action in human tumor cell lines. *Life Sci*. 2004; 76 (5): 545-558 DOI: 10.1016/j.lfs.2004.07.09
14. Murray R. P, Rosenthal S. K, Pfaller A. M. Microbiología Médica. 5^{ta} ed. España: Elsevier España, S. A; 2007
15. Echevarría J, Iglesia D. Estafilococo meticilino resistente, un problema de salud actual en la emergencia de resistencia entre los Gram positivos. *Rev Med Hered* .2003;14 (4): 195-203 ISSN 1729-214X <https://doi.org/10.20453/rmh.v14i4.706>
16. Organización Mundial de la Salud. Resistencia a los antimicrobianos. OMS; 2016. Nota descriptiva.
17. Fernández K., Rodríguez J., Reyes L., et al. Comparación de actividad antibacteriana *in vitro* anti-*Staphylococcus aureus* de ocho antibióticos y cuatro diluciones de propóleos. *J. Selva Andina Res. Soc.* 2022; 13 (01): 35-48. DOI: <https://doi.org/10.36610/j.jsars.22.130100035>
18. Fuentes E., Toraño G., Velar R., et al. Actividad antimicrobiana del propol-5, un extracto etanólico de propóleos cubano. *Revista*

- Cubana de Farmacia. 2021; 54 (4): e590 Disponible en: https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/deed.es_ES
19. Sanpa S., Popova M., Tunkasiri T., et al. Chemical profiles and antimicrobial activities of Thai propolis collected from *Apis mellifera*. *Chiang Mai J. Sci.* 2017; 44: (2). 438-448 Disponible en: <http://epg.science.cmu.ac.th/ejournal/>
20. Hurtado de Barrera J. El proyecto de investigación: comprensión holística de la metodología y la investigación. 8ª.ed. Caracas. Ediciones Quirón. 2015
21. Gil M, González M, Orlandi O, et al. Actividad bacteriostática y bactericida de extractos etanólicos de propóleos venezolanos y europeos sobre *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*. *MedULA, Revista de Facultad de Medicina, Universidad de Los Andes.* 2014. 23(2). Disponible en: <http://www.saber.ula.ve/handle/123456789/42789>
22. Gupta R, Stangacio S. Apitherapy: holistic healing through the honeybee and bee products in countries with poor healthcare system. In: Gupta R, Reybroeck W, Van Veen J, Gupta A. (eds). *Beekeeping for poverty alleviation and livelihood security. Vol 1. Springer, Dordrecht.* 2014. 413-446 ID: 71056371 https://doi.org/10.1007/978-94-017-9199-1_15
23. Ghisalberti E. Propolis: A Review. *Bee World.* 1979; 60(2): 59-84. DOI: 10.1080/0005772X.1979.11097738 <http://dx.doi.org/10.1080/0005772X.1979.11097738>
24. Salatino A., Teixeira E., Negri G. et al. Origin and chemical variation of Brazilian propolis. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine.* 2005; 2(1): 33-38. DOI:10.1093/ecam/neh060
25. Salatino A., Fernandes C., Righi A. et al. Propolis research and the chemistry of plant products. *Nat. Prod. Rep.* 2011; 28(5): 925-936. <http://dx.doi.org/10.1039/c0np00072h>
26. Bankova V., Popova M and Trusheva B. Propolis volatile compounds: chemical diversity and biological activity: a review.

- Chemistry Central Journal*. 2014; 8(1): 28. Doi.10.1186/1752-153X-8-28
27. Castaldo S., Capasso F. Propolis, and old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*. 2002; 73 (1): 1-6 DOI: 10.1016/s0367-326x(02)00185-5.
28. Massaro C, Simpson J, Powell D, et al. Chemical composition and antimicrobial activity of honeybee (*Apis mellifera lingustica*) propolis from subtropical Eastern Australia. *Sci Nat*. 2015; 102: 68. <https://doi.org/10.1007/s00114-015-1318-z>
29. Popova M, Bankova V, Bogdanov S, et al. Chemical characteristics of poplar type propolis of different geographic origin. *Apidologie, Springer Verlag*. 2007; 38 (3): 306-311 ID: hal-00892262 <https://doi.org/10.1051/apido:2007013>
30. Silici S, Unlu M, Vardar G. Antibacterial activity and phytochemical evidence for the plant origin of Turkish propolis from different regions. *World J Microbiol Biotechnol*. 2007; 23 (12):1797-1803 DOI: 10.1007/s11274-007-9430-7.
31. Bonvehi J., Gutiérrez A. The antimicrobial effects of propolis collected in different regions in the Basque Country (Northern Spain). *World J Microbiol Biotechnol*. 2012; 28:1351-1358 DOI: 10.1007/s11274-011-0932-y
32. Gil M., Perelli A., et al. Actividad bacteriostática y bactericida de la tintura de propóleos sobre bacterias enteropatógenas. 2012. 16 (3): 021-025 ISSN 1316-7138 <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=375939022006>
33. Lopez F, Mondragón L, Hernández G. Los flavonoides y el sistema cardiovascular: ¿pueden ser una alternativa terapéutica? *Rev. Costarric. Cardiol*. 2006; 8 (1): 33-45 ISSN 1665-1731
34. Pérez H, Robles A. Aspectos básicos de los mecanismos de resistencia bacteriana. *Revista Médica MD*. 2013; 4 (3): 186-191 Disponible en: www.revistamedicamd.com

35. Daza R. Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. *Inf. Ter. Sist. Nac. Salud.* 1998; 22 (3): 57-67 ISSN 1130-8427
36. Tafur D, Torres J, Villegas M. Mecanismos de resistencia a los antibióticos en bacterias Gram negativas. Asociación colombiana de infectología. 2008; 12 (3): 223-233 ISSN 0123-9392
37. Vargas R, Torrescano G, Sanchez A. El propóleo: conservador potencial para la industria alimentaria. *INTERCIENCIA* 2013; 38 (10): 705-711 <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33929482003>
38. Ramírez A, García A, Longa A, et al. Manual práctico de bacteriología general. Mérida: Universidad de Los Andes. Publicaciones Vicerrectorado académico, CODEPRE. 2006.
39. Herrera M. Pruebas de sensibilidad antimicrobiana: metodología de laboratorio. *Rev. Med. Hosp. Niños (Costa Rica)* [Internet]. 1999; 34 (suppl): 33-41. Available from: http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?scrip=sci_arttext&pid=S1017-85461999000100010&lng=en. [cited 2018 jan 15]
40. Silva C., García B., Desongles J., et al. Técnico especialista en laboratorio del Servicio Gallego de Salud (SERGAS). P ed. España: Editorial Mad, S. L. 2006.
41. Martínez L, Porras A. Lectura interpretada del antibiograma. Guía ABE 2019. <http://www.guia-abe.es> (último acceso 27 Noviembre 2022).
42. Hurtado de Barrera J. Metodología de la investigación: guía para una comprensión holística de la ciencia. 4ª.ed. Caracas. Ediciones Quirón. 2010.
43. Montero M, Vayas L, et al. Evaluación de dos métodos para medir la sensibilidad de inhibición de crecimiento de la cepa certificada de *Staphylococcus aureus* subsp. *Aureus*. *Rev Inv Vet Perú* 2018; 29 (4): 1543-1547 <http://dx.doi.org/10.15381/rivep.v29i4.15185>

44. Cervantes E, García R, Salazar P. Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Rev Latinoam Patol Clin Med Lab*. 2014; 61 (1): 28-40
45. Zendejas G, Avalos H, Soto M. Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. *Rev Biomed* 2014; 25 (3): 129-143
<http://www.revbiomed.uady.mx/pdf/rb142534.pdf>
46. Durán A, Zhurbenko R, et al. Propuesta de una modificación en la formulación del medio agar manitol salado utilizado en el aislamiento de estafilococos de importancia clínica. *Rev Cubana Med Trop* 2004; 56 (3): 172-177
47. Echavarría J, Iglesias D. Estafilococo meticilino resistente, un problema actual en la emergencia de resistencia entre los Gram positivos. *Rev Med Hered* 2003; 14 (4): 195-203
<https://doi.org/10.20453/rmh.v14i4.706>
48. Castellano M, Perozo A, Vivas R. Detección fenotípica y molecular de resistencia a meticilina en *S. aureus*. *Kasmera* 2008; 36 (1): 28-38
<https://produccioncientificaluz.org/index.php/kasmera/article/view/4820>
49. Ruiz M, Torres M, et al. Detección de la resistencia a meticilina e identificación de *Staphylococcus* spp. en hemocultivos positivos amplificando los genes *mecA* y *nucA* con el sistema LightCycler®. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2005; 23 (4): 208-12
<https://doi.org/10.1157/13073146>
50. Velasquez B., Montenegro S. Actividad antimicrobiana de extractos etanólicos de propóleos obtenidos de abejas *Apis mellifera*. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*. 2017. 8 (1): 185-193
<https://doi.org/10.22490/21456453.1848>.
51. Samara N., Benítez N., et al. Actividad antibacteriana y composición cualitativa de propóleos proveniente de dos zonas

- climáticas del departamento del Cauca. Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial. 2011. 9 (1): 8-16 ISSN 1692-3561
52. Cruz A, Rodríguez N, Rodríguez C. Evaluación in vitro del efecto antibacteriano de los extractos de *Bidens pilosa*, *Lantana cámara*, *Schinus molle* y *Silybum marianum*. Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica 2010; 13 (2): 117-124 <https://doi.org/10.31910/rudca.v13.n2.2010.738>
53. Grajales J, Chirinos J, Lozano E, *et al.* Actividad antimicrobiana de propóleos de abejas sin aguijón en combinación con ajo, *Allium sativum* (*Amaryllidaceae*). *Rev. Biol.trop.* 2021; 69 (1): 23-35 DOI: 10.15517/rbt.v69i1.41241

www.bdigital.ula.ve