

# UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

---

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias  
División de Ciencias Biológicas y Ambientales  
BIOLOGIA



BIBLIOTECA

“DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ANTIBIOTICA DEL  
PROPOLEO EN *Staphylococcus aureus* Y EN *Streptococcus*  
*pyogenes in vitro*”.

---

## TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
LICENCIADO EN BIOLOGIA

P R E S E N T A

MARTHA DALIA CANIZALES RAMIREZ

GUADALAJARA, JAL.

JUNIO DE 1995

---



*Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias*  
*División de Ciencias Biológicas y Ambientales*  
*Biología*

1481/94

C. MARTHA DALIA CANIZALES RAMIREZ  
P R E S E N T E . -

Manifestamos a usted, que con esta fecha ha sido aprobado el tema de tesis "DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ANTIBIOTICA DEL PROPOLEO EN Staphylococcus aureus Y EN Streptococcus pyogenes in vitro" para obtener la Licenciatura en Biología.

Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director de dicha tesis el Biol. Miguel A. Campa Molina.

C.U.C.B.A.



DIV. DE CS.  
BIOLOGICAS Y  
AMBIENTALES

A T E N T A M E N T E

"PIENSA Y TRABAJA"

Las Agujas Zapopan, Jal. 29 de Noviembre de 1994

EL DIRECTOR

*Fernando Alfaro Bustamante*  
DR. FERNANDO ALFARO BUSTAMANTE

EL SECRETARIO

*Guillermo Barba Calvillo*  
BIOL. GUILLERMO BARBA CALVILLO

c.c.p.- El Biol. Miguel A. Campa Molina, Director de Tesis.-pte.

c.c.p.- El expediente del alumno

FAB/GBC/cglr.

C. M. en C. Alfonso Islas Rodríguez  
Director de la División de Ciencias  
Biológicas y Ambientales.

P R E S E N T E.

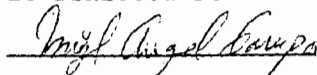
Por medio de la presente, nos permitimos informar a Usted, que habiendo revisado el trabajo de tesis que realizó la Pasante Martha Dalia Canizales Ramírez, código no. 82244212 con el título "DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ANTIBIOTICA DEL PROPOLEO EN Staphylococcus aureus y Streptococcus pyogenes in vitro". Consideramos que reúne los méritos necesarios para la impresión de la misma y la realización de los exámenes profesionales respectivos.

Comunicamos lo anterior para los fines a que haya lugar.

A T E N T A M E N T E

Guadalajara, Jal. a 24 de Mayo de 1995.

EL DIRECTOR DE TESIS

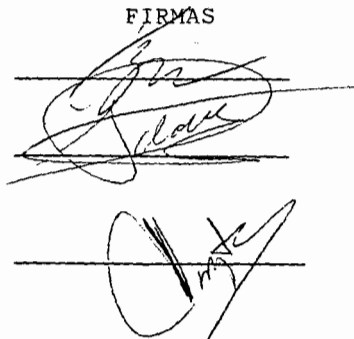


Biol. Miguel Angel Campa Molina.

SINODALES

- 1.- Dra. Galina Zaitzeva Petrovna
- 2.- Dr. Oswaldo Palacios Rivera
- 3.- M.C. Margarita Bonilla Moreno

FIRMAS



## AGRADECIMIENTOS

### A MI DIRECTOR DE TESIS

Biol. Miguel Angel Campa Molina.  
Por su gran apoyo y excelente dirección en esta tesis.

### A MIS ASESORES

Biol. Teresa Aceves Esquivias.  
Biol. Roberto Vázquez Cabrales.  
Dr. Hugo Castañeda Vázquez.  
Por su apoyo, asesoría e invaluables consejos que me brindaron.

### A USTEDES

Martín, Alejandro, Ricardo, Consuelo, Roberto, Paco y Lupita.  
Con quienes he compartido gratos momentos y que de alguna manera me  
brindaron su ayuda, dedicación y comprensión.

### A PRODUCTOS DEL COLMENAR

Por el apoyo brindado para la realización de la presente.

## CON RESPETO Y GRATITUD

A mi Universidad  
A mi Escuela  
A todos mis Maestros.  
GRACIAS.

## DEDICATORIA

### A MIS PADRES

Pedro y Josefina quienes siempre me han brindado su apoyo en cada una de mis decisiones tomadas y por haber depositado su confianza en mí.

### A MI ESPOSO Y A MIS HIJOS

Martín, Alejandro y Jacqueline por el amor y apoyo que siempre me han brindado y que me ha motivado para salir adelante.

### A MIS HERMANOS

Elvira, Roberto, Pedro, Ernesto y Miguel por su apoyo y amistad.

## INDICE

CUADROS Y FIGURAS	III
RESUMEN	IV
I INTRODUCCION	1
II GENERALIDADES	4
2.1 Descripción botánica de la zonas en las que fué colectado el propóleo.	4
2.2 Descripción bacteriana.	5
2.3 Efecto de los antibióticos.	7
III OBJETIVOS	9
IV HIPOTESIS	10
V REVISION DE LITERATURA	11
5.1 Estudios previos de la acción antimicrobiana del propóleo.	11
VI MATERIAL Y METODO	15
6.1 Preparación de inóculos.	16
6.2 Aplicación del inóculo.	16
6.3 Aplicación de los discos.	17
6.4 Período de incubación y medición de halos de inhibición.	17
6.5 Cuantificación de datos.	18
VII RESULTADOS Y DISCUSION	19
VIII CONCLUSIONES	32
IX LITERATURA CITADA	33
X ANEXO	37

## INDICE DE CUADROS Y FIGURAS

CUADRO	I	19
CUADRO	II	22
CUADRO	III	24
FIGURA	1	21
FIGURA	2	23
FIGURA	3a	26
FIGURA	3b	27
FIGURA	4	28
FIGURA	5	29

## RESUMEN

El objetivo del presente trabajo fué evaluar la actividad antibiótica del propóleo en *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes* "in vitro", así como también determinar el grado de efectividad del propóleo colectado en tres zonas geográficas del Edo. de Jalisco (zona templada semiárida, zona templada de montaña y zona tropical) en las bacterias antes mencionadas.

Los extractos alcohólicos de propóleo que se utilizaron (33, 66 y 90%) fueron proporcionados por el Biol. Miguel Angel Campa Molina y las pruebas para evaluar la actividad antimicrobiana se realizaron en el Laboratorio de Microbiología de la División de Ciencias Biológicas de la U de G.

El método utilizado para determinar la susceptibilidad de las bacterias al propóleo fué el de Bauer-Kirby (prueba de difusión en disco), en el cual se logró observar que *S. pyogenes* mostró sensibilidad al propóleo de las tres zonas geográficas en estudio y *S. aureus* fué sensible sólo al propóleo de la zona templada semiárida.

Se concluyó, que los extractos de propóleo tuvieron actividad antibiótica sobre las cepas utilizadas y que la capacidad bactericida del propóleo depende de su origen; siendo el propóleo de la zona templada semiárida el que mostró mayor inhibición del crecimiento bacteriano para las dos cepas en estudio.



## I INTRODUCCION

Entre los recursos naturales más utilizados hoy en día, se encuentran los productos de la colmena, debido a sus propiedades nutritivas y terapéuticas; como son la miel, la jalea real, el polen, veneno de abejas y el propóleo (Loirish, 1985 citado por Rojas, 1988).

El propóleo es una sustancia resinosa de color pardo rojizo o amarillo verdoso producido por las abejas a partir de resinas vegetales y que tiende a oscurecerse. Es un agente protector y medicinal desarrollado por las plantas, para la defensa antimicrobiana de sus yemas; su calidad y composición química varía según la fuente vegetal y en las diferentes regiones geográficas y climáticas (P. Jean-Prost, 1989).

La palabra propóleo proviene del griego própolis, donde *pro* significa "delante" ó "en defensa de" y *polis* significa "ciudad", por lo que en el concepto quedaría "en defensa de la ciudad", extrapolando a las abejas sería "en defensa de la colonia" (Travasset, 1987).

De una colonia de abejas, solo un grupo de ellas se dedica a la colecta de resinas para la elaboración de esta valiosa sustancia, por lo que son denominadas abejas propolizadoras. Una vez que la abeja propolizadora ha encontrado la resina en la yema de un árbol, inicia su faena para desprenderla, para esto utiliza sus apéndices, es decir su primer par de patas, con las cuales amasa la resina recolectada mientras le agrega secreción de sus glándulas mandibulares para facilitar su tarea. Después regresa a su colmena y le entrega su carga de propóleo a otra abeja que espera dentro de esta, la cual lo depositará donde se requiera (Jean-Marie, 1993).

Las abejas utilizan el propóleo con fines múltiples:

\*Cerrar las grietas que se forman en el interior de la colmena, para evitar las corrientes de aire o frío.

\*Reducir al mínimo la piquera ó entrada a la colmena o crear obstáculos que impidan la entrada de enemigos.

\*Embalsamar los cadáveres de los enemigos que se hayan introducido en la colmena una vez que los han matado y que no pudieron sacar de la misma por ser demasiado voluminosos, evitando de esta forma su descomposición debido a la propiedad fundamental bactericida del propóleo.

\*Barnizar las celdas de los panales destinados para la cría, con el fin de esterilizarlos para permitir el próximo desarrollo de un huevecillo (Hollands, et al. 1988).

El propóleo es capaz de asegurar a la familia de abejas de la protección microbiológica que esta necesita. La colmena es una enorme aglomeración de abejas (hasta 50,000) que entran y salen, y al mismo tiempo en ella se almacenan enormes cantidades de sustancias nutritivas y larvas que constituirían un excelente medio de cultivo para cientos de microorganismos, sin embargo en su interior no hay descomposición, la microbiota es reducida y los agentes patógenos para las abejas son muy pocos. Debido a la presencia de propóleo en todas partes, con su enorme potencialidad es capaz de asegurar un medio estéril, que influye hasta en el exterior de la colmena (Pérez, 1988).

El propóleo se emplea ampliamente en la preparación de medicamentos en diversos países del mundo, no sólo en Europa, donde tiene uso terapéutico desde hace muchos años, sino además en algunos países de América con Brasil y Uruguay (Temasio, 1983).

Este producto es apreciado mundialmente por su diversidad de propiedades, entre las que se destacan su efecto bacteriostático, bactericida y antiséptico, de ahí que tenga un amplio uso en medicina humana y veterinaria (Salman, et al. 1988).

El principal uso que se le da al propóleo es en las infecciones, úlceras y enfermedades bacteriológicas, un país que lo usa mucho es Cuba. En nuestro país el propóleo es utilizado frecuentemente en infecciones de vías respiratorias superiores, debido a la propiedad bactericida que a él se atribuye.

*Streptococcus pyogenes* y *Staphylococcus aureus* son dos bacterias patógenas importantes en este tipo de infecciones. Normalmente, durante el tratamiento de las enfermedades infecciosas es necesario emplear diversos antibióticos, pero su uso indiscriminado provoca la aparición de cepas bacterianas resistentes a antibióticos, lo cual se debe a mutaciones de carácter adaptativo ó a plásmidos. Esto justifica la búsqueda constante de nuevas sustancias con propiedades antibióticas para emplearlas contra estos microorganismos.

Son pocos los estudios que se han hecho en México en relación a la actividad antibiótica del propóleo, se sabe a través de la experiencia empírica, así como de las numerosas publicaciones científicas de otros países en las últimas fechas que este producto de las abejas, es una sustancia antibiótica importante y aplicable en numerosas cepas microbianas; sin embargo en México no se le ha dado el valor y reconocimiento desde el punto de vista científico y terapéutico, por lo que se plantea la necesidad de iniciar las investigaciones básicas de esta sustancia, en espera de que los resultados puedan ofrecer una posibilidad en la terapia de los casos en los que se involucren este tipo de bacterias.

## II GENERALIDADES

### 2.1 Descripción botánica de las zonas en las que fué colectado el propóleo.

Debido a que la calidad y composición química del propóleo varía según la fuente vegetal y en las diferentes regiones geográficas y climáticas, a continuación se menciona el tipo de vegetación predominante de las zonas en las que fué colectado el propóleo:

\* Zona templada semiárida: Bosque de pino y encino; esta representado por la asociación de especies dominantes de los géneros *Pinus* "pinos" como *P. devoniana*, *P. oocarpa*, *P. leiophylla*, *P. montezumae*, *P. michoacana*, *P. hartwegii*, y del género *Quercus* "encinos" como *Q. castanea*, *Q. rugosa*, *Q. laurina*, *Q. resinosa*, *Q. candicans*, etc.

\* Zona templada de montaña: Bosque mesófilo de montaña, los elementos arbóreos más comunes son: "capulin" *Prunus serotina* sp. *capuli*, "encino blanco" *Q. candicans*, "encino colorado" *Q. castanea*, *Q. laurina*, *Cornus disciflora*, *Carpinus tropicalis*, *Sauravia serrata*, "sabino" *Podocarpus reichei*, etc.

\* Zona tropical: Bosque tropical caducifolio, en esta zona las especies arbóreas más representativas son: "palma de abanico" *Sabal rosei* y "coyul" *Acrocomia mexicana*, "coquito de aceite" *Orbignya guacuyule*, "capiro" *Sideroxylon capiri*, "mezquite" *Prosopis juliflora*, etc. (Villarreal, 1992).

## 2.2 Descripción bacteriana

### 2.2.1 *Streptococcus pyogenes*

Es un organismo esférico u oval, casi siempre capsulado, de más o menos  $1\mu\text{g}$  de diámetro y dispuesto en cadenas de longitud variable (Quentin, 1991).

Las colonias son redondas, lisas, brillantes, con aspecto de gotas de rocío, de aproximadamente 1mm de diámetro (Carter, 1985).

*S. pyogenes* tiene una resistencia "promedio" a la mayor parte de agentes físicos y químico. Es moderadamente resistente a la desecación, pero la pasteurización lo destruye y los desinfectantes comunes lo matan con rapidez. El organismo es sensible a una amplia gama de agentes quimioterapéuticos; en muy breve tiempo desarrolla resistencia a los sulfonamídicos y algunos antibióticos, pero por fortuna no a la penicilina, que es el antibiótico terapéutico indicado.

*S. pyogenes* es capaz de causar varias enfermedades dependiendo del sitio de la infección y la virulencia de la cepa bacteriana. Esta cepa bacteriana puede causar probablemente la más amplia variedad de infecciones en el hombre que otras bacterias patógenas solas. Esta bacteria se encuentra presente en la piel, mucosas del aparato genital, respiratorio superior y digestivo (Carter, 1985).

*S. pyogenes* es la causa más frecuente de faringitis bacteriana. Suele transmitirlo un portador o un individuo infectado por vía de gotitas de saliva, contacto directo o por fomites (Walter, 1984).

### 2.2.2 *Staphylococcus aureus*

Son cocos grampositivos que se presentan en racimos, son aerobios, catalasa positivos, no poseen movimiento, no forman esporas y son fermentativos. Esta cepa bacteriana habita en la piel y mucosas especialmente en los aparatos respiratorio superior y digestivo (Cowan y Steel s, 1985).

Las colonias presentan un diámetro de hasta 4mm, son colonias redondas, lisas y brillante.

Este comensal ampliamente distribuido, posee cepas capaces de invadir tejidos y producir abscesos, pústulas, diversas infecciones piógenas y, en ocasiones causar bacteremia y septicemia. La transmisión suele ser por contacto directo o mediante fomites.

Estos microorganismos son sensibles a los desinfectantes comunes, pero el pus los protege. A diferencia de otras bacterias, algunos estafilococos pueden sobrevivir en forma vegetativa a temperaturas de 60°C durante 30 min. (Carter, 1985).

*S. aureus* al parecer siempre se adapta hasta transformarse en un germen resistente a fármacos, y como resultado, muchos antibióticos pierden su eficacia para combatir las infecciones que el causa. Muchas cepas de estafilococos productores de penicilasa pueden ser tratados adecuadamente con meticilina, que es una penicilina semisintética resistente a aquella enzima (Volk, 1989).

### 2.3 Efecto de los antibióticos.

Uno de los principales triunfos de la ciencia médica en el siglo XX, ha sido la virtual erradicación de muchas enfermedades infecciosas con el uso de agentes quimioterapéuticos. La sífilis fué la primera enfermedad conocida para cuyo tratamiento se emplearon agentes quimioterapéuticos, siendo alrededor del año 1910, cuando Paul Ehrlich sintetizó el salvarzán, remedio específico capaz de causar daño al microorganismo sin dañar al paciente (Rojas, 1990).

Desde hace mucho tiempo se conocen diferentes preparados químicos como medicinas populares, los que se aplican en el tratamiento de algunas enfermedades infecciosas como, por ejemplo, los indios del Perú que descubrieron la acción curativa de la corteza del árbol de la quina, utilizado por ellos para aliviar los síntomas del paludismo (Koneman, 1985).

Un antibiótico es un producto metabólico de un organismo que es perjudicial o inhibitorio, en muy pequeñas cantidades para otros microorganismos (Pelczar, 1990).

Para que una sustancia tenga utilidad como agente quimioterapéutico:

- Tiene que envenenar al parásito, y causar poco o ningún daño al paciente.
- Ser capaz de actuar sobre el parásito por penetrar en las células y los tejidos del huésped.
- No alterar los mecanismos naturales de defensa del huésped, como la fagocitosis y la producción de anticuerpos (Carter, 1985).

Los antibióticos inhiben o matan a los microorganismos por diversas vías:

- Inhiben la síntesis de la pared celular.
- Alteración de la permeabilidad de la membrana celular o inhibición del transporte activo a través de la membrana.
- Interfieren con la síntesis de proteínas.
- Inhiben la síntesis del ácido nucleico (Jawetz, 1981).



### III OBJETIVOS

#### General:

Determinar la capacidad bactericida del propóleo en *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes* mediante pruebas *in vitro*.

#### Particular:

Comparar el grado de efectividad bactericida del propóleo colectado en 3 zonas geográficas del estado de Jalisco (zona tropical, zona templada semiárida y zona templada de montaña).

#### IV HIPOTESIS

Tomando en cuenta que el propóleo es utilizado por las abejas para aislar a la colmena de los efectos contaminantes del medio ambiente externo y para esterilizar las celdillas donde han de depositarse los huevecillos de las futuras abejas y que además en circunstancias especiales las abejas propolizan a algunos animales que logran matar dentro de la colmena para evitar que estos se descompongan y contaminen la colonia, se puede inferir que el propóleo tiene propiedades bactericidas y antisépticas muy efectivas.

## V REVISION DE LITERATURA

### 5.1 Estudios previos de la acción antimicrobiana del propóleo.

Desde hace miles de años el propóleo ha sido usado con fines medicinales, al igual que otros productos de la colmena, la referencia más antigua data del Antiguo Egipto, donde era bien conocido por los sacerdotes, quienes tenían en sus manos la medicina química y arte de embalsamar los cadáveres usando esta resina con ese fin (Jean-Marie, 1993).

Aristóteles habla del própolis en su Historia de los animales y lo menciona como remedio a las infecciones de la piel, llagas y supuraciones (Travesset, 1987).

En el transcurso del siglo I a. de C., el célebre sabio Varrón, el poeta Virgilio y, en nuestro primer milenio, Plinio el Viejo y el médico griego Dioscórides, polemizan en sus trabajos y escritos sobre el origen del própolis discusión que ha llegado hasta nuestro días (op.cit.).

El própolis era bien conocido por los incas, quienes los utilizaban para todo proceso de infección febril. Del mismo modo se han encontrado algunas muestras de su uso en Francia, para el tratamiento de llagas. Pero parece que el própolis alcanzó su mayor apogeo alrededor de 1900 en Africa del sur, durante la guerra de los Boers. Ahí se aplicaba para curar las heridas por sus propiedades desinfectantes y cicatrizantes. Según afirmaban los médicos militares, los resultados eran excelentes (Gali, 1991).

Durante la Segunda Guerra Mundial, y por iniciativa del químico L. Handross, el própolis fué experimentado en las clínicas quirúrgicas de Sverdlovsk (URSS) con muy buenos resultados.

Entre los años 1899-1902 este producto fué utilizado exclusivamente para curar las heridas. En aquellos tiempos se desconocían los antibióticos y sin el empleo de esta resina colocada directamente sobre las heridas, algunos pacientes habrían muerto por infección (Salman, et al., 1988).

El científico francés Rémy Chauvin emprendió, durante los años 1965-1966, una serie de investigaciones sobre las bacterias que infectan a los insectos y constató que las abejas, a diferencia de otros insectos, están libres de ciertas bacterias. Estas experiencias se repitieron varias veces llegando a la convicción de que las abejas ocupan una posición especial entre los demás insectos, pues rarísimas veces sufren los ataques de las bacterias y de virus (Travasset, 1987).

Gracias al trabajo de investigadores de diversas disciplinas y a medida que se encuentran nuevos usos y aplicaciones a esta resina su valor aumenta en todas partes del mundo, de hecho ha sido considerado como uno de los productos de mayor valor de los que se obtienen gracias al trabajo de las abejas.

La acción antimicrobiana del propóleo está reconocida mundialmente y así lo avalan los numerosos trabajos realizados en este campo en Europa (Lavie, 1980). Se informa que sus extractos poseen acción antibacteriana, antiviral y antimicótica (Kivalkina, 1980. citado en; Rojas, 1988).

Asís (1979) y Galardi y col. (1985) han reportado el efecto antimicrobiano del propóleo, destacando fundamentalmente su acción frente a gérmenes gram positivos, aunque existe diversidad de criterios en este aspecto (Salman, et al. 1988).

Valdés y Salman (1988) han reportado la acción antimicrobiana de los extractos alcohólicos de propóleo frente a las bacterias gram positivas como gram negativas, mostrándose una mayor efectividad sobre las bacterias gram positivas.

Rojas, 1988. Ha reportado el efecto antibacteriano de un extracto alcohólico de propóleo y de 4 subfracciones preparadas a partir de él, así como de un producto puro aislado de la fracción A<sub>2</sub>, en cepas de *Staphylococcus aureus* de origen clínico humano, estas cepas mostraron una elevada sensibilidad a las fracciones A<sub>2</sub> y B<sub>1</sub>, producto puro y al propóleo.

En trabajos realizados sobre el efecto antibiótico del propóleo sobre cepas de *Staphylococcus aureus* se observó que el extracto alcohólico de propóleo mostró gran actividad antibacteriana in vitro al inhibir el 95% de estas cepas (Rojas, 1990).

Según estudios realizados en 1984 con extractos alcohólicos de propóleo cubano, se demostró que estos tienen una fuerte actividad antibacteriana, en particular sobre bacterias gram positivas, entre ellas *Staphylococcus aureus* (Rojas, Carelys, 1990).

Estudios realizados en Cuba con diferentes extractos alcohólicos de propóleo frente a cepas bacterianas gram positivas, mencionan que el tipo de extracción empleado influye en la actividad de esta sustancia, mientras que no es así la concentración de alcohol con la que es preparado cada extracto (Rojas, Obregón, 1990).

De igual forma se reporta que el efecto antimicrobiano del propóleo es directamente proporcional a su concentración, lo mismo depende de su origen, ya que su composición química y por consiguiente su valor antibiótico varía (Alonso, et al. 1988).

Scheller, et al. 1975, en sus trabajos realizados con respecto a la actividad antibacteriana del propóleo no establecen el tamaño del halo como criterio de sensibilidad, ellos mencionan que el propóleo a bajas concentraciones (9mg) que produzcan un halo superior a 8mm, se dice que las cepas son sensibles.

Investigaciones hechas hasta la fecha muestran la permanencia de un cierto número de sustancias que determinan las propiedades físico-químicas y biológicas del propóleo. Así pues, sus propiedades bactericidas y bacteriostáticas son aplicables a numerosas cepas microbianas como ciertos estafilococos, estreptococos y salmonelas. Estas propiedades están en relación, entre otras sustancias como: el ácido benzoico, el ácido ferúlico, la galangina y la pinoembrina que contiene (Donadieu, 1980 citado en: Rodríguez, et al. 1988).

## VI MATERIAL Y METODO

Las pruebas para evaluar la actividad antimicrobiana del propóleo se realizaron en el Laboratorio de Microbiología de la División de Ciencias Biológicas de la U de G, los cultivos bacterianos utilizados son parte del cepario del mismo laboratorio.

Los diferentes extractos de propóleo fueron proporcionados por el Biol. Miguel Angel Campa Molina; se utilizaron 3 extractos alcohólicos de propóleo de cada zona (templada semiárida, templada de montaña y tropical) a 3 diferentes concentraciones (33, 66 y 90%).

Como control se sustituyó el extracto alcohólico de propóleo por alcohol etílico de 96 en las diluciones correspondientes.

Se realizó una comparación de la actividad antibacteriana del propóleo con la de 12 antibióticos comerciales gram positivos (AM ampicilina, SXT trimetropin-sulfatomexazol, CAZ ceftazidima, TE tetraciclina, CTX cefotaxima, CXM cefuroxima, PEF pefloxacina, PE penicilina, GE gentamicina, DC dicloxacilina, CF cefalotina, E eritromicina).

Se realizaron 10 pruebas de antibiograma para cada bacteria de cada una de las zonas en estudio a las diferentes concentraciones (33, 66 y 90%). Así como también para los antibióticos comerciales.

El método utilizado para determinar la susceptibilidad de las bacterias al propóleo fué el de Bauer-Kirby.

Se utilizaron dos cepas gram positivas (*Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*) a los cuales se les dió pases a cajas de agar sangre para comprobar su pureza, previo a su utilización.

#### 6.1 Preparación de inóculos.

Los inóculos fueron preparados a partir de 4 ó 5 colonias tomadas de las placas de agar sangre y llevadas a tubos con 5 ml de caldo soya tripticasa, los cuales se incubaron a 37°C durante 18-24 horas, ajustándose su concentración hasta que la turbidez del medio fué equivalente al estándar No. 0.5 de MacFarland. Esto equivale a una concentración de aproximadamente  $10^8$  organismos/ml. (Delaat, 1983).

El estándar 0.5 de MacFarland se preparó añadiendo 0.5 ml de sulfato de bario a 99.5 ml de ácido sulfúrico 0.36 N. La comparación de turbidez entre el estándar y el caldo, se efectuó mirándolos contra una cartulina blanca con líneas negras horizontales (Koneman, 1985).

#### 6.2 Aplicación del inóculo.

El medio utilizado para pruebas de sensibilidad es el Mueller-Hinton, en este medio se sembró *Staphylococcus aureus*. *Streptococcus pyogenes* se sembró en agar soya tripticasa.

Para inocular las placas se utilizó el método de Barry "cobertura de agar", en esta técnica se agregó 1 ml de la suspensión bacteriana en estudio en 2 ml de agar infusión cerebro-corazón mientras éste se hallaba aún líquido. La suspensión bacteriana en agar se volcó uniformemente sobre la superficie del medio formando una fina película. Una vez



seco el inóculo la placa esta lista para la colocación de los discos con el antibiótico sobre la superficie del agar (Koneman, 1985).

### 6.3 Aplicación de los discos.

Los discos utilizados fueron de papel filtro con un diámetro de 7 mm a los cuales se agregaron 2 gotas de extracto alcohólico de propóleo a fin de quedaran bien empapados y se dejaron secar por espacio de 5 min. para su posterior colocación en las placas de agar.

Al llevar a cabo la prueba de susceptibilidad de Bauer-Kirby, los discos se colocaron en la superficie del agar manualmente, utilizando una pinza estéril. Los discos se colocaron por lo menos a 22 mm uno del otro y a 14 mm del borde de la placa para evitar que las zonas de inhibición se superpongan o se extiendan hasta el margen de la placa. Los discos se presionaron suavemente con la punta de la pinza para asegurar un firme contacto con el agar, cuidando de no moverlos una vez colocados en su lugar.

### 6.4 Período de incubación.

Las placas se incubaron después de la aplicación de los discos a 35°C por espacio de 18-24 horas. Después de 18 horas de incubación, aparecieron las zonas de inhibición alrededor de los discos que contienen el antibiótico a los cuales el organismo en estudio fué susceptible. Los diámetros de estas zonas se midieron cuidadosamente por la parte posterior de la placa. Se empleó una regla marcada en milímetros, la medida fué la del diámetro del halo incluido el disco.

## 6.5 Cuantificación de datos.

Con la media aritmética se calcularon los halos medios de inhibición de cada extracto utilizado (33,66 y 90%) de las 3 zonas geográficas para cada bacteria.

## VII RESULTADOS Y DISCUSION

Nuestros resultados nos permitieron corroborar la acción antimicrobiana del propóleo frente a 2 bacterias gram positivas, así mismo pudimos comprobar que su efecto antibacteriano depende de su origen.

Como se puede observar en el cuadro 1 *S. pyogenes* mostró sensibilidad a las 3 concentraciones de propóleo de las 3 zonas en estudio, siendo la zona templada semiárida la que nos dió mayores halos de inhibición, le siguió el propóleo de la zona tropical y después el de la zona templada de montaña (Figura 1). Nuestros resultados están en relación con los mencionados por Alonso, et al. 1988 en los cuales reporta que el efecto antimicrobiano del propóleo depende de su origen, ya que su composición química es diferente por consiguiente su valor antibiótico varía.

Cuadro 1. Actividad antibiótica de los extractos alcohólicos de propóleo en *S. pyogenes*. Halos medios de inhibición en mm.

Zona geográfica	Extractos		
	33%	66%	90%
Templada semiárida	11.77	12.05	14.37
Tropical	10.5	11	11.07
Templada de montaña	9.25	9.5	9.5

Rojas, et al. 1990 menciona que existe una relación directa lineal entre la concentración de propóleo y el tamaño del halo, nosotros pudimos observar que en la zona templada semiárida entre más concentrado estaba el propóleo mayor era su efectividad, pero también hubo casos en los que el tamaño del halo a la concentración del

66 y 90% fué el mismo, como sucedió con el propóleo de la zona tropical y templada de montaña, esto puede ser debido a la susceptibilidad de la cepa a los principios activos presentes en el propóleo que se expresaron en su totalidad a dicha concentración (66%). También es importante tomar en cuenta que existe cierto número de sustancias que determinan las propiedades fisico-químicas y biológicas del propóleo, las cuales determinan sus propiedades bactericidas y bacteriostáticas. Nuestros resultados nos permiten mencionar que la calidad y composición química del propóleo varía según la fuente vegetal y región geográfica de donde provenga (Jean-Prost, 1989).

Debido a que el alcohol posee propiedades bactericidas, se podría pensar que el efecto antimicrobiano de los extractos alcohólicos de propóleo se deban al alcohol en vez de al propóleo, pero por los resultados obtenidos pudimos comprobar que la actividad antimicrobiana es debida al propóleo y no al solvente utilizado en los extractos, nuestros resultados estan en correspondencia con los reportados por Rojas y Obregón 1990.

Temp. montaña Tropical Temp. semiárida

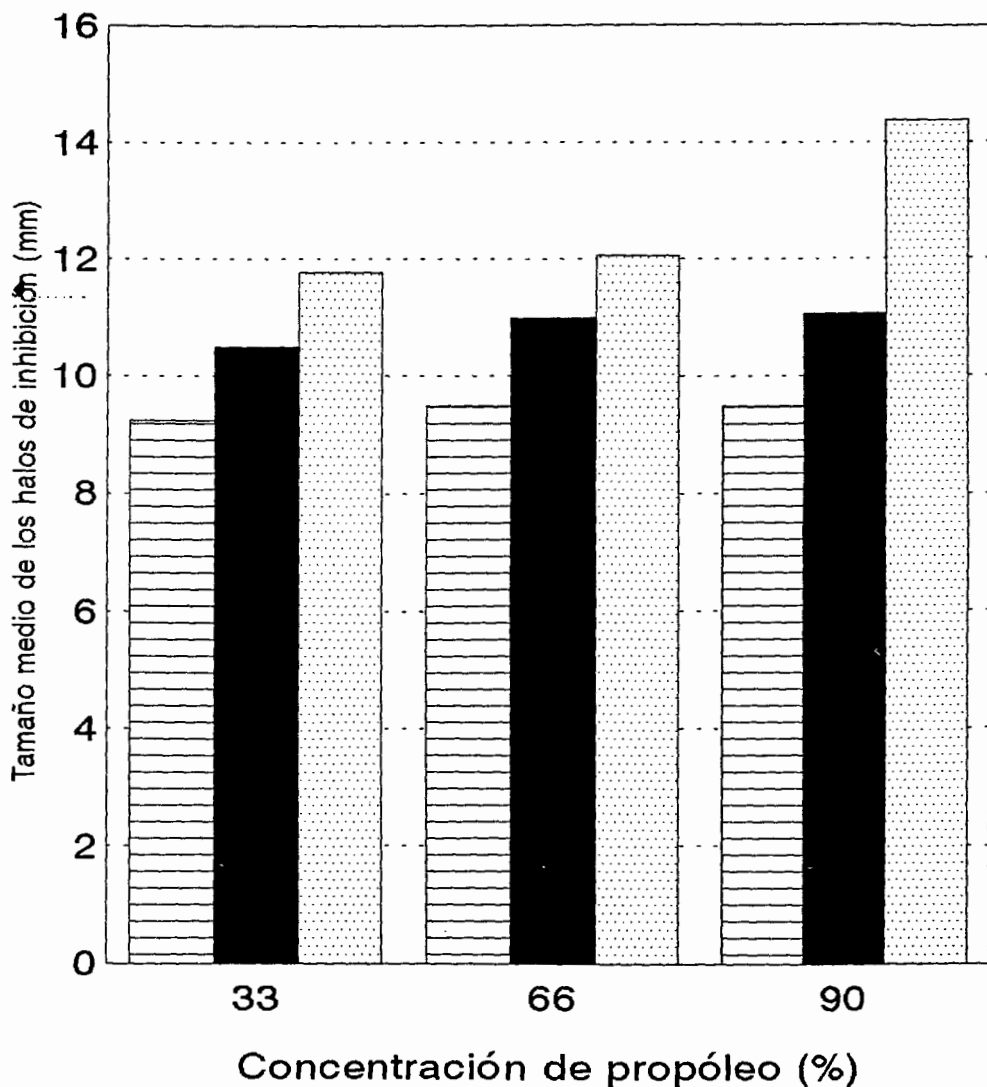


Fig. 1 Actividad antibiótica de los extractos alcohólicos de propóleo de las tres zonas en estudio en S. pyogenes.

*S. aureus* mostró sensibilidad sólo al propóleo de la zona templada semiárida, las otras dos zonas no formaron halo de inhibición (Cuadro 2), por lo cual se puede decir que los extractos de estas zonas actuaron como bacteriostáticos ya que no se observó crecimiento por abajo de los discos.

Cuadro 2. Actividad antibiótica de los extractos alcohólicos de propóleo en *S. aureus*. Halos medios de inhibición en mm.

zona geográfica	Extractos		
	33%	66%	90%
Templada semiárida	8.12	8.93	9.75
Templada de montaña	7	7	7
Tropical	7	7	7

En nuestros resultados obtenidos es necesario destacar que la cepa de *S. aureus* presentó un patrón de resistencia elevado frente al propóleo. Los halos de inhibición de la zona templada semiárida no fueron muy significativos ya que el diámetro de estos oscilaba entre 8 y 9 mm. Según Scheller, *et al.* 1975 no establecen el tamaño del halo como criterio de sensibilidad ellos mencionan que las cepas son sensibles al propóleo cuando a bajas concentraciones producen un halo superior a 8 mm.

Debido a que *S. aureus* fué sensible sólo al propóleo de la zona templada semiárida (Figura 2), nuestros resultados no concuerdan con los reportados por Rojas, 1990 en los cuales menciona que este microorganismo muestra una elevada sensibilidad al propóleo, esto puede ser debido a que existen propóleos que son diferentes en función de numerosos factores, entre los cuales el más importante es el origen botánico, así como

también la susceptibilidad de la cepa en estudio a los principios activos presentes en el propóleo.

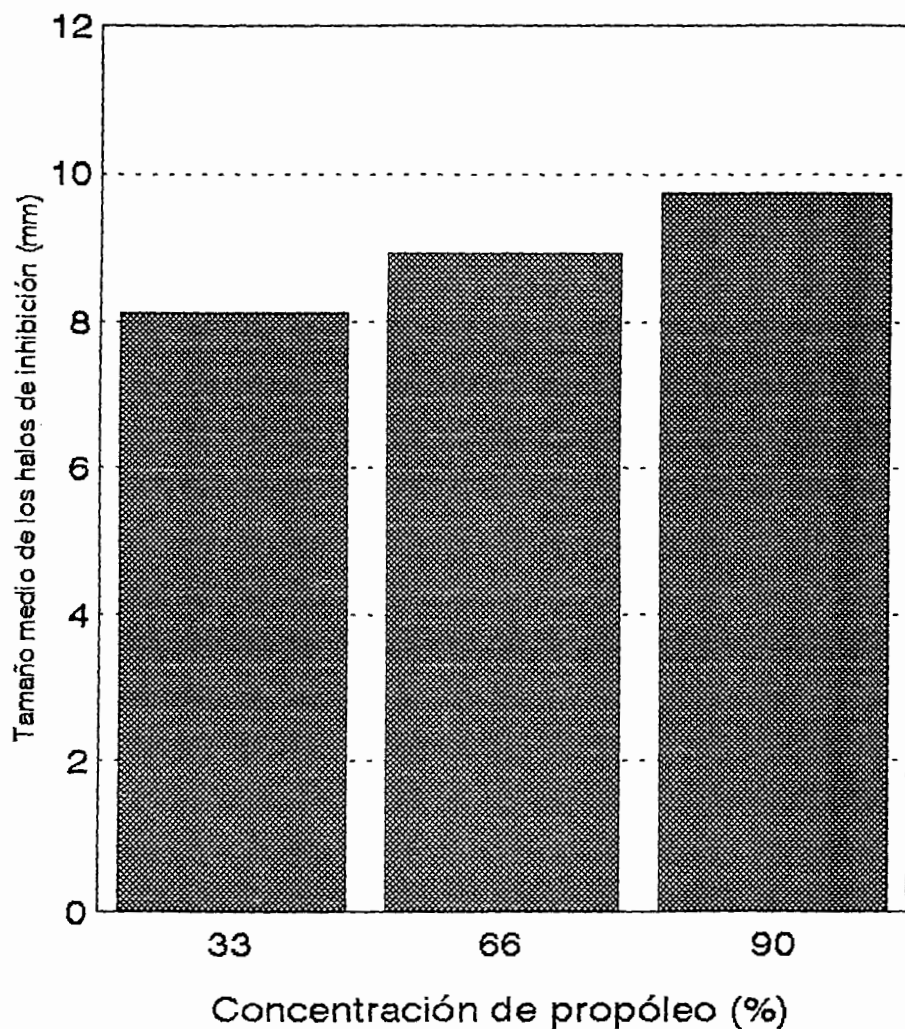


Fig. 2 Actividad antibiótica del propóleo de la zona templada semiárida en S. aureus.

Cuadro 3. Susceptibilidad de *S. aureus* y *S. pyogenes* a los antibióticos comerciales.

S= Sensible      R= Resistente      I= Intermedio

ANTIBIOTICO	Inhibición en mm	Inhibición en mm.
	<i>S. pyogenes</i>	<i>S. aureus</i>
AM	22.33 S	24.4 R
SXT	15.66 I	21.4 S
CAZ	21.33 S	12.4 R
TE	18.66 I	18 I
CTX	27.66 S	23.16 S
CXM	24.66 S	22 S
PEF	11.66 R	18.83 I
PE	19.66 S	23.5 R
GE	13.66 I	15.5 S
DC	17.33 S	16.83 S
CF	26.33 S	26.8 S
E	17.33 I	17.2 I

*S. aureus* mostró resistencia a ampicilina (AM) y penicilina (PE), sensibilidad intermedia a eritromicina (E). Por lo que podemos decir que esta bacteria presentó una elevada resistencia a los antibióticos indicados para su tratamiento.

En la Figura 3a se pueden observar los halos medios de inhibición de los antibióticos, en la que el halo más bajo fué de 12.4 mm el cual corresponde a la CAZ (ceftazidima), en este caso no fue posible hacer una comparación con el propóleo, ya que



la inhibición que nos dió el propóleo de la zona templada semiárida fué poco significativa en relación con los antibióticos comerciales.

*S. pyogenes* mostró sensibilidad a ampicilina (AM) y penicilina (PE), sensibilidad intermedia a eritromicina (E), que son los antibióticos terapéuticos indicados para su tratamiento. En la figura. 3b se puede observar el tamaño de los halos medios de inhibición de los antibióticos utilizados con los que se hizo la comparación con el propóleo, por lo que la PEF (pefloxacina) y GE (gentamicina) fueron los que más se aproximaban a los halos obtenidos con el propóleo de la zona templada semiárida.

*S. pyogenes* mostró más sensibilidad al propóleo que *S. aureus*, por lo que se puede decir, que no todos los propóleos son igualmente aptos para combatir las infecciones bacterianas y que hay bacterias mucho más sensibles que otras a los principios activos presentes en el propóleo.

La calidad del propóleo de la zona templada semiárida es de gran valor, ya que la menor concentración (33%), en *S. pyogenes* superaba la actividad bactericida de las otras dos zonas, aún en los extractos al 90%. También es importante mencionar que en la cepa de *S. aureus* el propóleo de la zona templada semiárida al 90% superaba la actividad inhibitoria del propóleo de la zona templada de montaña en *S. pyogenes* (Figura 4).

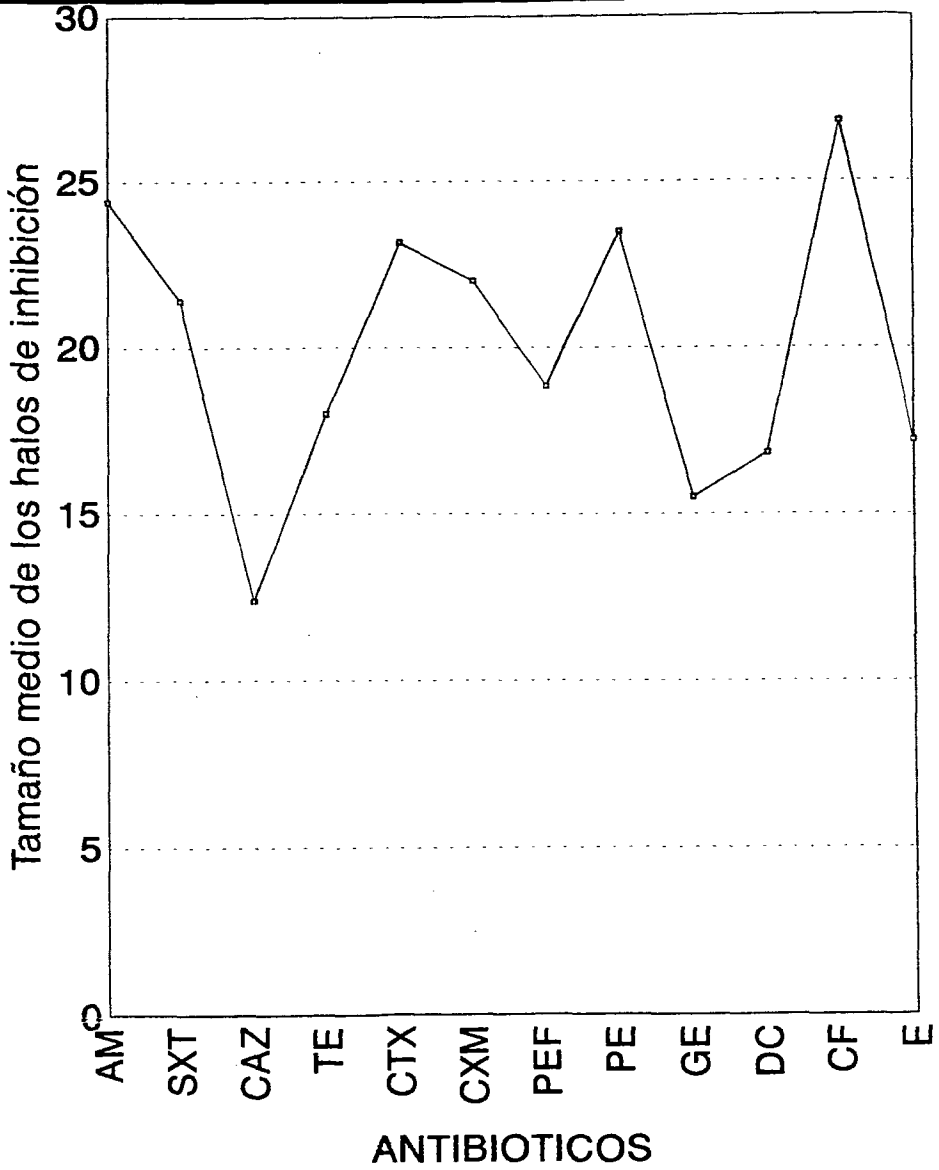


Fig. 3a Susceptibilidad de S. aureus a los antibióticos comerciales.

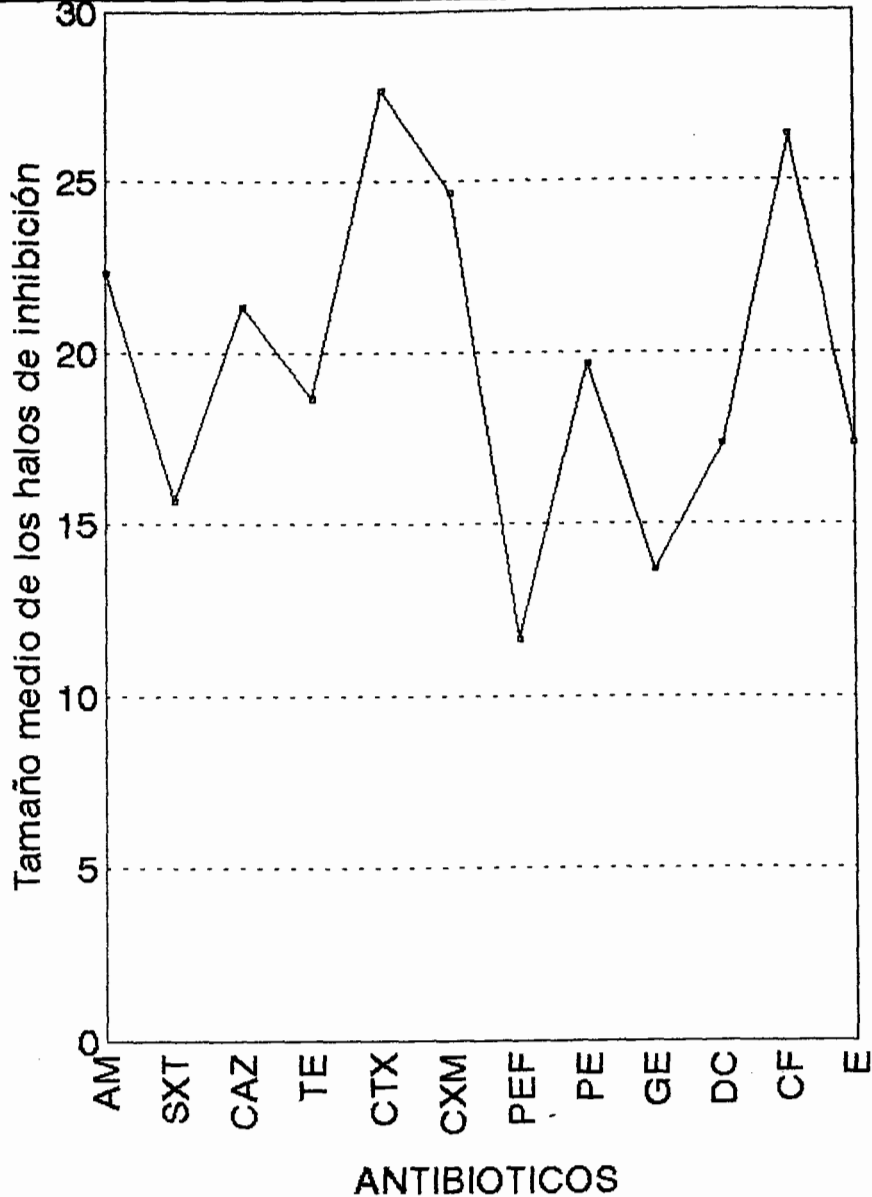


Fig. 3b Susceptibilidad de *S. pyogenes* a los antibióticos comerciales.

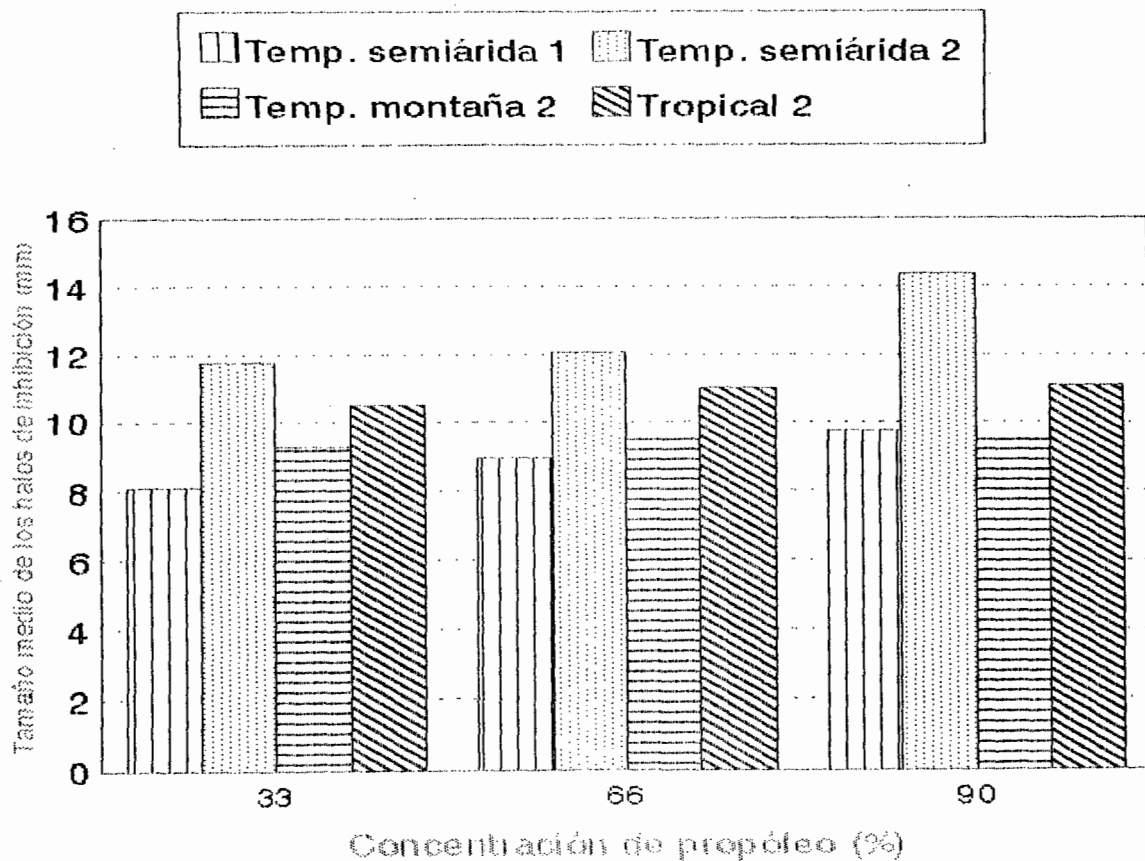


Fig. 4 Comparación entre la concentración del propóleo de las 3 zonas geográficas y el diámetro medio de inhibición en *S. aureus* y *S. pyogenes*.  
1 = *S. aureus*      2 = *S. pyogenes*

Temp. semiárida PEF GE

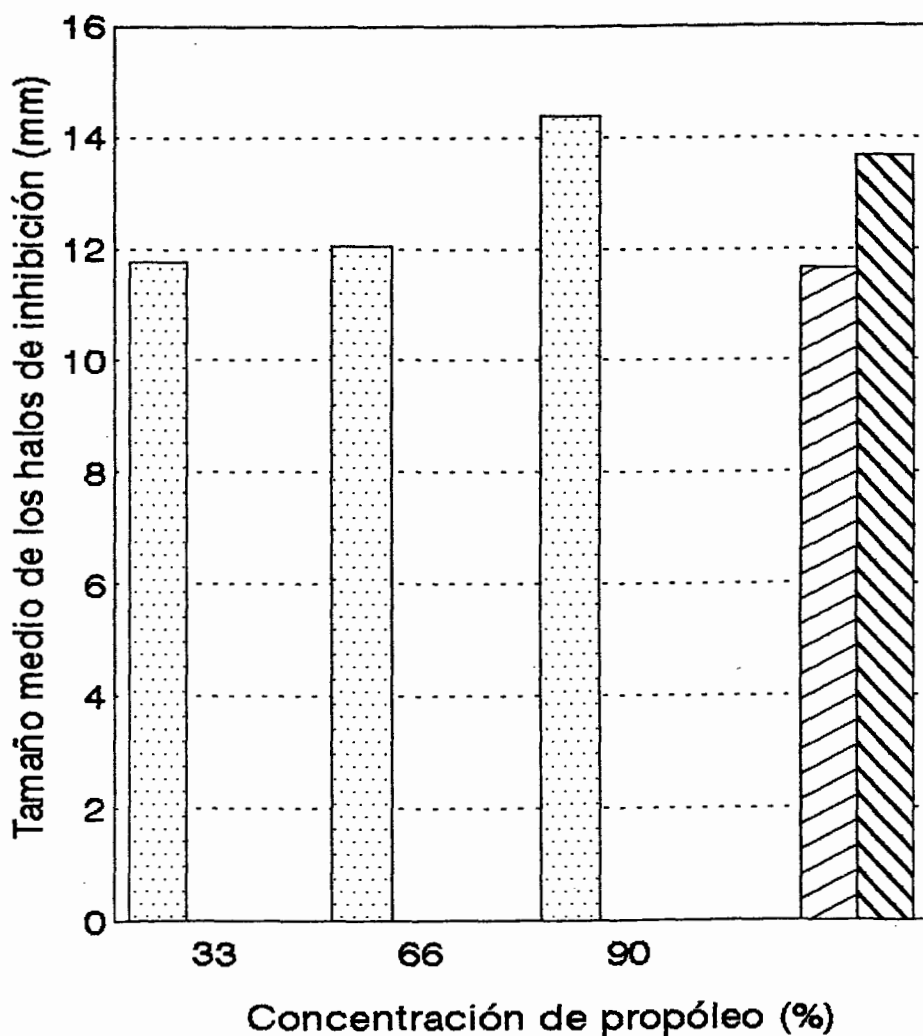


Fig. 5 Comparación del propóleo de la zona templada semiárida con 2 antibióticos GE (gentamicina) y PEF (pefloxacina) en S. pyogenes.

Como pudimos darnos cuenta el propóleo de la zona templada semiárida es muy importante, pues fué el que mostró mayor inhibición del crecimiento bacteriano para las dos cepas en estudio. Esto nos permite ratificar que el valor antibiótico del propóleo está en estrecha relación con su fuente de origen.

Al realizar la comparación de los extractos alcohólicos de propóleo de la zona templada semiárida frente a los antibióticos comerciales, los halos obtenidos son comparables con los de la pefloxacina (PEF) y gentamicina (GE) en *S. pyogenes* (Figura 5).

Debido a que *S. aureus* presentó una elevada resistencia, los halos obtenidos de la zona templada semiárida fueron poco significativos en relación con la de los antibióticos comerciales.

Esta comparación no quiere decir que el valor antibiótico del propóleo sea menos eficaz que la penicilina o cualquier otro antibiótico por el tamaño del halo, pues se tiene que tomar en cuenta que el tamaño de la zona de inhibición depende de ciertas propiedades físico-químicas de cada antibiótico, que influyen *in vitro* sobre la velocidad de difusión en agar.

La acción bactericida del propóleo nos permite evaluarlo como un producto con gran efectividad y un amplio espectro de acción por lo que su uso en el tratamiento de infecciones causadas por bacterias resulta de gran valor, teniendo en cuenta que puede existir el fenómeno de discordancia de la sensibilidad *in vitro* e *in vivo*.

También influye en acentuar sus propiedades bactericidas, su condición de antibiótico natural de las plantas y de los animales superiores, más asimilable por el hombre que los antibióticos derivados de bacterias.

## VIII CONCLUSIONES

1. La capacidad bactericida del propóleo depende de su origen y de la susceptibilidad del microorganismo en estudio.
2. El propóleo de la zona templada semiárida fué el que mostró mayor actividad antibiótica para las dos cepas bacterianas.
3. En la zona templada semiárida entre más concentrado estaba el propóleo mayor era la inhibición del crecimiento bacteriano.  
En la zona tropical y templada de montaña la acción bactericida del propóleo se expresó en su totalidad a la concentración del 66%.
4. Por el tamaño del halo el propóleo de la zona templada semiárida es comparable con la PEF (Pefloxacina) y GE (Gentamicina).
5. El control resultó negativo, lo cual indica que la acción antibacteriana es debida al propóleo.



## IX LITERATURA CITADA

Alonso Xiomara, et al. 1988. Evaluación del efecto antibacteriano "in vitro" de los biopreparados CNB R-5 y CNB T-55. Primer simposio de los efectos del propóleo en la salud humana y animal. Varadero, Ciudad de la Habana. pp: 37-42.

Carter G. R. 1985. Bacteriología y Micología Veterinarias. Editorial Manual Moderno. pp: 110-126.

Cowan y Steel's 1985. Manual para la identificación de bacterias de importancia médica. Editorial CECSA. 2 Edición. pp: 81-88.

Delaat A.N.C. 1983. Microbiología. Editorial Interamericana. 2 Edición. pp: 331-337.

Gali Hero 1991. Miel de abejas, jalea real y polen. Editorial Gómez y Gómez Hnos. 3 Edición. pp: 23-26.

García-Amaro, E. y R. Vidal-Zepeda 1992. Climatología. Enciclopedia temática de Jalisco. Tomo 1 Geografía. Gobierno del Estado de Jalisco. México. pp: 105-115

Hollans, et al. 1988. El propóleo y sus posibilidades en el tratamiento de la coccidiosis del conejo. Primer simposio sobre los efectos del propóleo en la salud humana y animal. Varadero, Ciudad de la Habana. pp: 100-108.

Jawetz, Melnick y Adelberg 1981. Microbiología Médica. Editorial Manual Moderno. 9 Edición. pp: 110-113.

Jean-Marie Philippe, 1993 Guía del apicultor. Ediciones Mundi-Prensa. pp: 245-246.

Jean-Prost P. 1989. Apicultura. Ediciones Mundi-Prensa. 3 Edición. pp:429-431.

Koneman, Allen, Dowell, Sommers 1985. Diagnóstico Microbiológico. Editorial Médica Panamericana. pp: 380-393.

Pamies Travasset J.M. 1987. Medicina Natural. Miel, jalea real y própolis. Editorial EDISAN. pp: 36-47.

Pelczar-Reid-Chan 1990. Microbiología. Editorial Mc Graw-Hill. 2 Edición. pp: 426-428.

Pérez A. 1988. Primer simposio de los efectos del propóleo en la salud humana y animal. Varadero, Ciudad de la Habana. pp: 11-16.

Quentin-Russell 1991. Bacteriología y Micología Médicas. Editorial Interamericana Mc Graw-Hill. 2 Edición. pp: 180-204.

Rodríguez, et al. 1988. Tratamiento de la giardiasis crónica en adultos por intubación duodenal con propóleo. Primer simposio de los efectos del propóleo en la salud humana y animal. Varadero

Rojas Nidia y Sonia Lugo 1988. Efecto antifúngico del propóleo sobre cepas del género Candida. Primer simposio sobre los efectos del propóleo en la salud humana y animal. Varadero, Ciudad de la Habana. pp: 42-53.

Rojas, et al. 1988. Acción antibacteriana de fracciones parciales u un producto aislado de propóleo sobre cepas de *Staphylococcus aureus*. Primer simposio sobre los efectos del propóleo en la salud humana y animal. Varadero, Ciudad de la Habana. pp: 29-36.

Rojas Nidia. 1988. Premisas necesarias para la elaboración de medicamentos antimicrobianos a base de propóleo. Primer simposio sobre los efectos del propóleo en la salud humana y animal. Varadero, Ciudad de la Habana. pp: 256-259.

Rojas Nidia y Sonia Lugo 1988. Acción antimicrobiana del extracto alcohólico de propóleo. Primer simposio sobre los efectos del propóleo en la salud humana y animal. Varadero, Ciudad de la Habana.

Rojas Nidia y Soraya Piloto 1990. Aislamiento de *Pseudomona aeruginosa* en pacientes quemados y su sensibilidad frente al propóleo. Revista Biología. Vol. II, No.1. Facultad de Biología, Universidad de la Habana. pp:57-63.

Rojas Nidia y Karelys 1990. Efecto antibiótico del propóleo frente a cepas de *Staphylococcus aureus* de origen clínico. Revista Cubana Farm 24(1):45-50. Facultad de Biología. Universidad de la Habana.

Rojas Nidia y Margarita Obregón 1990. Acción antimicrobiana de los extractos alcohólicos de propóleo. Revista cubana Farm 24(1):34-44 . Facultad de Biología. Universidad de la Habana.

Scheller, et al. 1975. Estudio comparativo de la sensibilidad de los estafilococos al propóleo y a los antibióticos. Propóleos. Bucarest. Ed. Apimondia. pp:47.

Temesio P. 1983. Resultados y consideraciones sobre el tratamiento local con propóleo en lesiones observadas en diabeticos. Investigación clínica. Montevideo. Lab. Apiter.

Valdés Gisela, M. Ruíz y Milena Martín 1988. Características de los propóleos de los municipios Mariel y Madruga de la provincia la Habana. Primer simposio sobre los efectos del propóleo en la salud humana y animal. Varadero, Ciudad de la Habana. pp: 28.

Villarreal de Puga L.M. y M.P. Tena Meza 1992. Vegetación y flora. Enciclopedia temática de Jalisco. Tomo 1 Geografía. Gobierno del Estado de Jalisco. México. pp: 181-209.

Volk-Kadner-Parsons 1989. Microbiología Médica. Editorial Interamericana Mc Gram-Hill. 3 Edición. pp: 365-367.

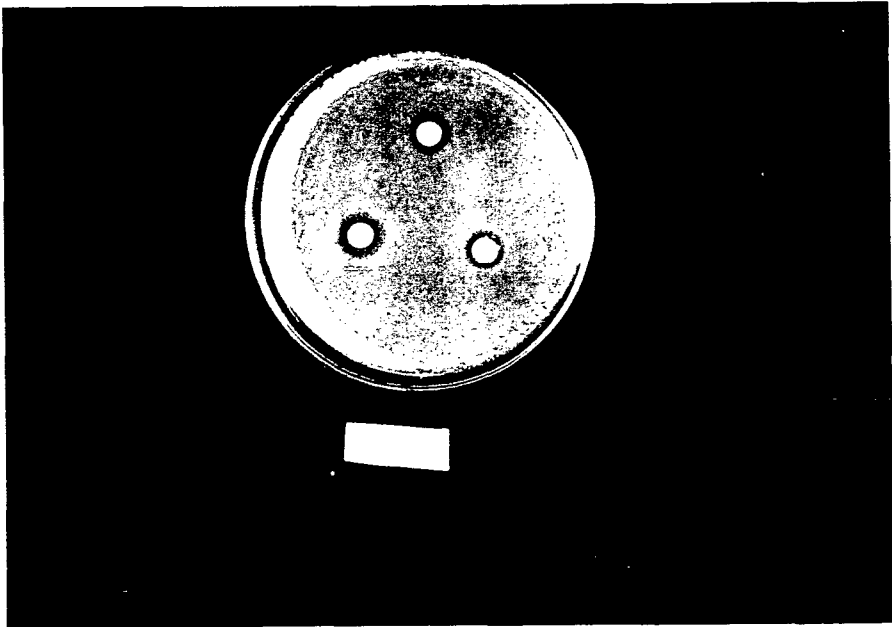
Walter-McBee 1984. Introducción a la Microbiología. Editorial CECSA. 3 Edición. pp: 313-315.

A N E X O

a)



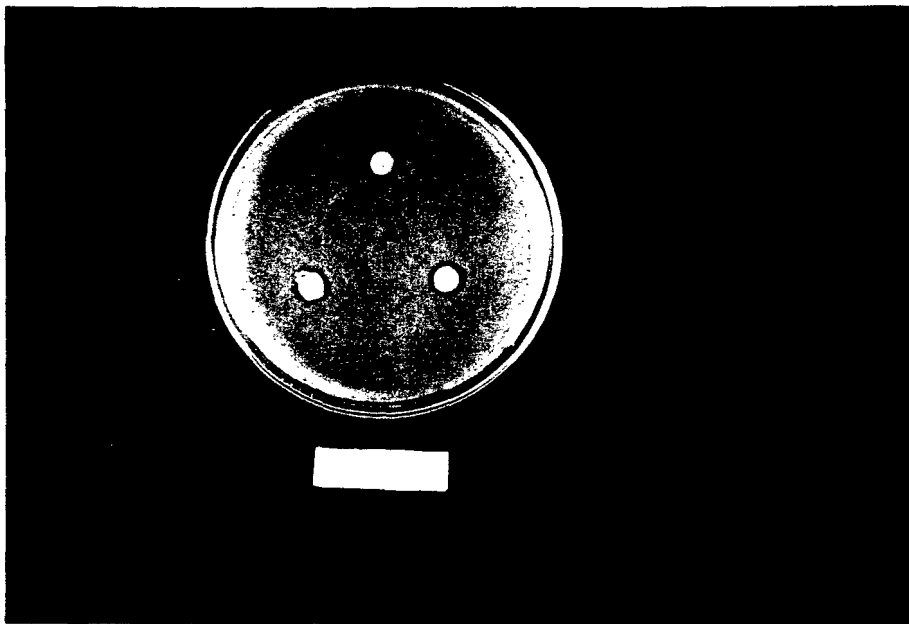
b)



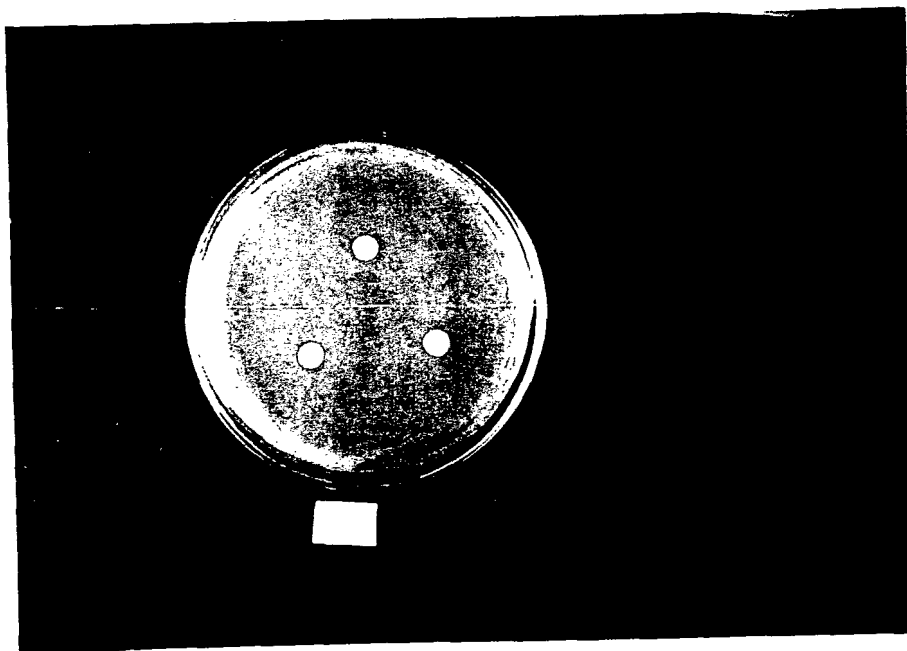
Halos de inhibición del propóleo (33,66 y 90%) en *S. pyogenes*.

a) Zona templada semiárida.

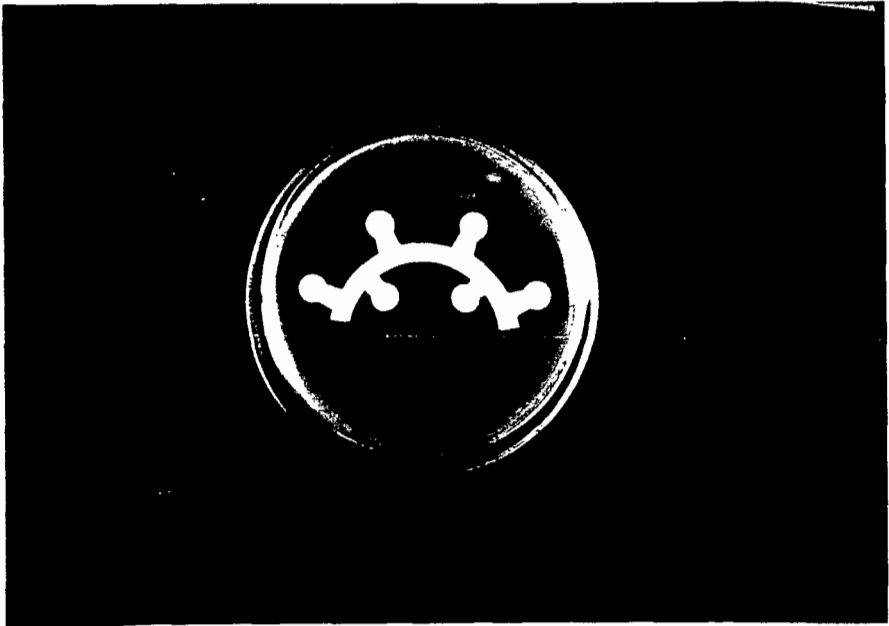
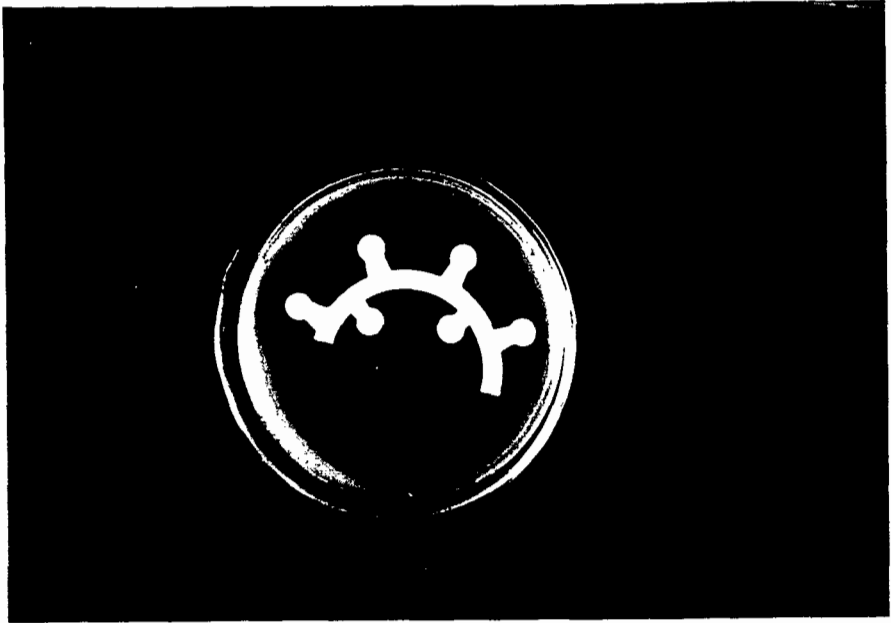
b) Zona tropical.



Halos de inhibición del propóleo (33,66 y 90%) de la zona templada de montaña en *S. pyogenes*.



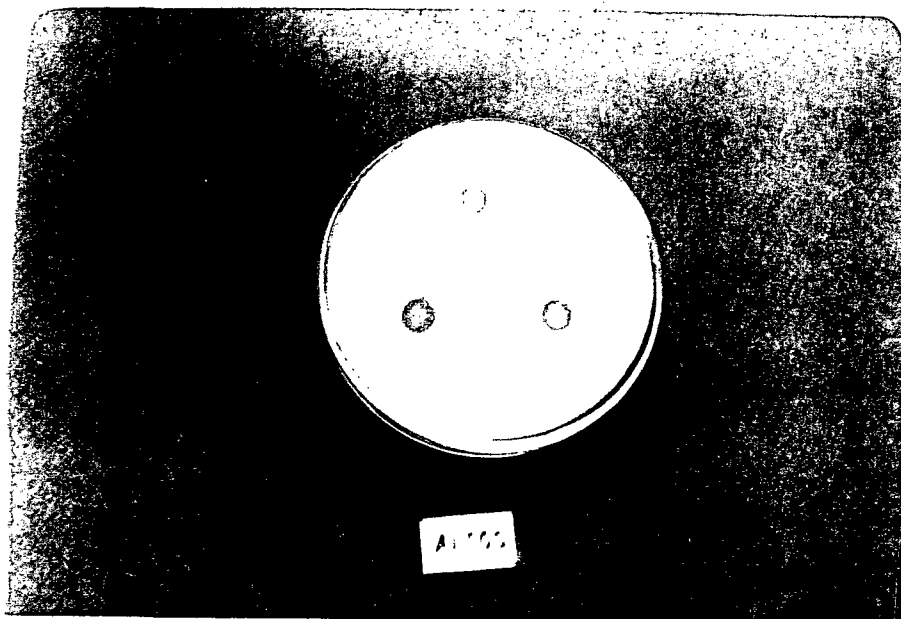
Alcohol al 10,33 y 66% en *S. pyogenes*.



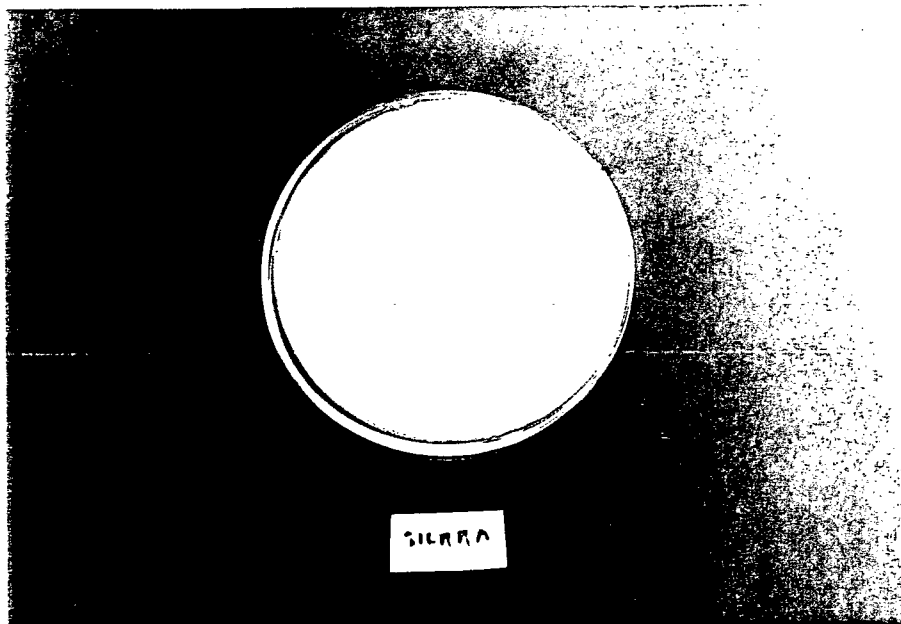
*S. pyogenes* y su sensibilidad a los antibióticos comerciales.



a)



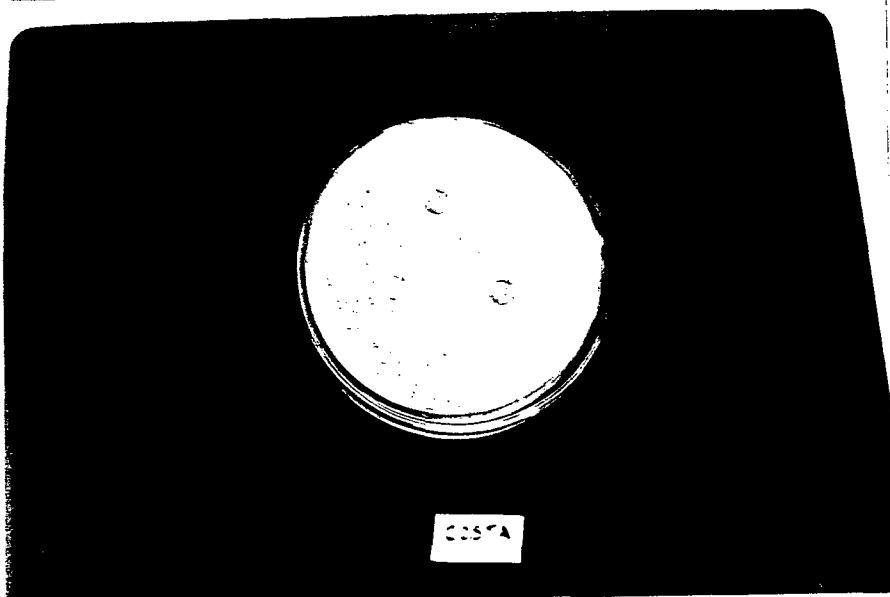
b)



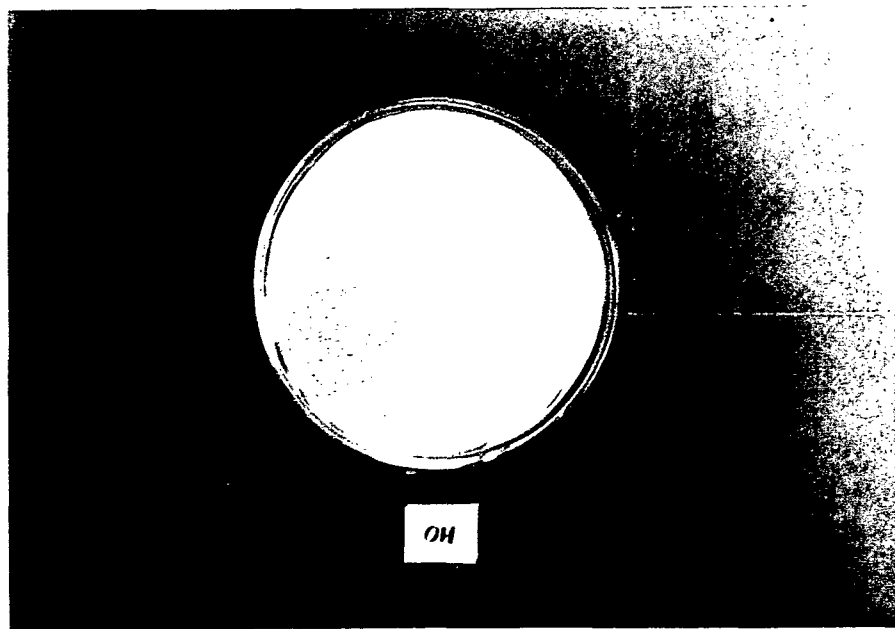
Halos de inhibición del propóleo (33,66 y 90%) en *S. aureus*.

a) Zona templada semiárida.

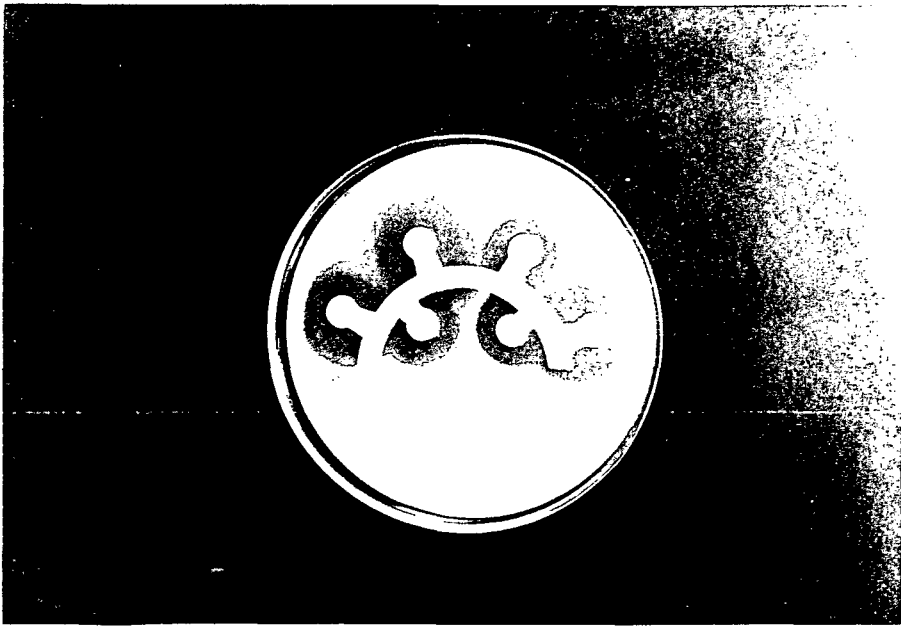
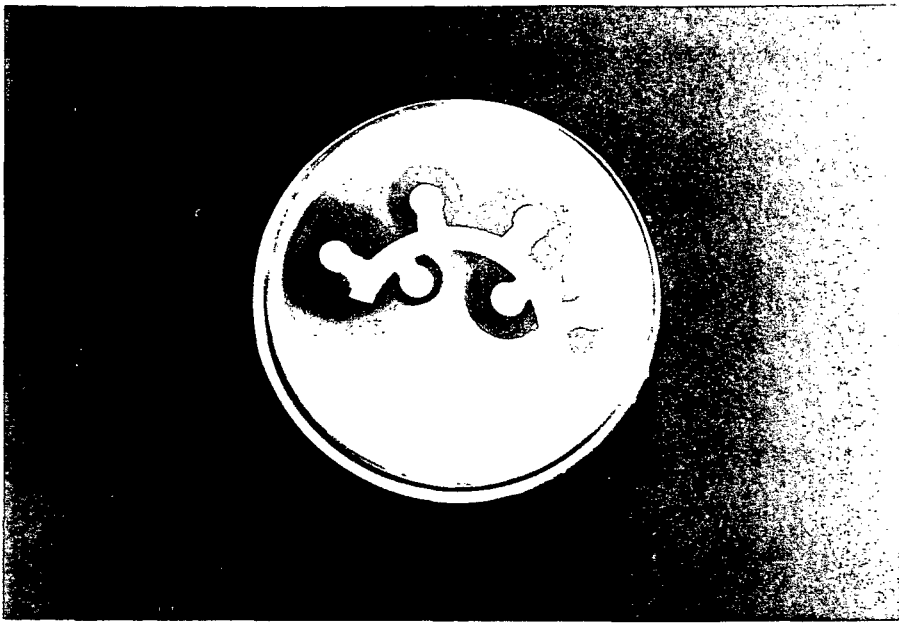
b) Zona templada de montaña.



Acción antimicrobiana del propóleo de la zona tropical en *S. aureus*.



Alcohol al 10, 33 y 66 % en *S. aureus*.



*S. aureus* y su sensibilidad a los antibióticos comerciales.