

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA



ESTUDIO DEL EFECTO ANTIBIOTICO DE UN EXTRACTO DE PROPOLEOS
Y CIPROFLOXACINA CONTRA *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y
Salmonella enterica serovar *Typhimurium*

TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR

JOSUE ISAAC NUÑEZ FLAMENCO

ANDREA GABRIELA UMANZOR ECHEVERRIA

PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIADO(A) EN QUIMICA Y FARMACIA

NOVIEMBRE 2020

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR

MAESTRO ROGER ARMANDO ARIAS ALVARADO

SECRETARIO GENERAL

MAESTRO FRANCISCO ANTONIO ALARCON SANDOVAL

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA

DECANA

LICDA. REINA MARIBEL GALDAMEZ

SECRETARIA

LICDA. EUGENIA SORTO LEMUS

DIRECCION DE PROCESOS DE GRADUACION

DIRECTORA GENERAL

MSc. Cecilia Haydee Gallardo de Velásquez

TRIBUNAL CALIFICADOR

ASESORAS DE AREA EN: MICROBIOLOGIA

Dra. Tania Ethel Cuadra Zelaya

MSc. Coralia de Los Ángeles González de Díaz

DOCENTE ASESOR

MSc. Mario Herbert Romero Rivera

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos primeramente a Dios y a nuestra madre La Virgen María porque fueron nuestra guía en todo este proceso, a nuestras familias Núñez Flamenco y Umanzor Echeverría por brindarnos todo su apoyo incondicional en cada una de las decisiones tomadas y por su comprensión.

Agradecemos a las docentes asesoras de área Dra. Tania Ethel Cuadra Zelaya, MSc. Coralía de Los Ángeles González De Díaz y a MSc. Cecilia Haydee Gallardo de Velásquez por todo el trabajo, conocimientos y tiempo invertido para mejorar el trabajo presentado, así como también nuestro asesor de tesis Mario Herbert Romero Rivera porque nos motivó a seguir adelante y a no rendirnos y porque siempre buscaron una solución frente a cualquier imprevisto que surgió, por creer en nosotros y permitirnos vivir la experiencia de ganar un premio con este proyecto.

Gracias a todos los docentes y personal de la Facultad de Química y Farmacia por todo lo que nos enseñaron a lo largo de la carrera; por forjarnos como profesionales con moralidad y ética estando preparados para afrontar cualquier adversidad que se nos presente.

Josué Núñez y Andrea Umanzor

AGRADECIMIENTOS

Plasmando estos pensamientos desde lo más profundo de mi interior quiero agradecer primeramente a Dios, por ser mi luz, mi fortaleza, mi camino, mi razón de ser, así como también a nuestra madre la Virgen María por interceder ante nuestro Dios.

Agradezco al ángel que Dios puso en forma de ser humano, ese ser que llamamos madre; Rosa Delmy Flamenco así como también a mi Padre Jorge Orlando Núñez, que con sus sabios consejos me enseñó a sobrellevar mejor la vida y su apoyo incondicional en todo aspecto.

A mis hermanos Jorge Núñez, Juan Núñez y Manuel Núñez, que nunca dejaron de creer en mi para alcanzar mis sueños.

Así como también agradezco a nuestro asesor MSc. Mario Romero quien sin importar las dificultades de tiempo o recursos busco soluciones, a mis asesoras de área Dra. Tania Ethel Cuadra Zelaya, MSc. Coralia de Los Ángeles González De Díaz y a MSc. Cecilia Haydee Gallardo de Velásquez ya que ellas fueron la guía para presentar un trabajo de graduación de calidad, así mismo a la Lcda. Vianey de Abrego quien nos dio la oportunidad de utilizar las instalaciones de CENSALUD.

A mi tía Hilda Duran mi Prima Luz Duran y mi tío Carlos Hernández y a todos mis familiares que me apoyaron en todo aspecto.

A mi novia y compañera de tesis Andrea Umanzor quien me demostró que frente a cualquier adversidad no importa que tan grande sea, si estamos tomados muy fuerte de las manos de Dios podemos salir adelante.

Josué Núñez

DEDICATORIA

A Dios todo poderoso por ser esa razón de ser mejores personas y darnos esas fuerzas para continuar y a la Virgen Santísima por sus ruegos, así como también agradezco a mis padres Rosa Delmy Flamenco y Jorge Orlando Núñez ya que siempre me apoyaron sin importar las dificultades que enfrentamos.

A mis hermanos Jorge Núñez, Juan Núñez y especialmente a mi hermano Manuel Núñez que siempre estuvieron presentes cuando los necesite, también a mis familiares que viven en el exterior tía Hilda, tío Carlos que me demostraron que a pesar de la distancia siempre están para ayudarme.

A mis compañeros de carrera que dejaron de serlo y se convirtieron en mis amigos (Williams Flores, Harlen Campos, Verónica Martínez, Fátima Barrera) amigos que me demostraron su apoyo, empatía, lealtad.

A todas las personas que hicieron que esto fuera posibles amigos, compañeros, familiares.

Josué Núñez

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios por darme la sabiduría para seguir siempre adelante y por permitirme culminar mi carrera universitaria.

A mis padres Regina Guadalupe de Umanzor y Joaquín Alfredo Umanzor por siempre apoyarme y dejarme la mejor herencia que se puede dar a un hijo que es la educación.

A mis tíos Blanca Echeverría y Ángel Vitelio López por estar en los momentos difíciles y apoyarnos.

A mi abuela Griselda de Echeverría por ser un apoyo incondicional y siempre estar ahí.

A mi novio y compañero de tesis Josué Núñez por siempre estar en los momentos difíciles, por apoyarme incondicionalmente y por su paciencia en este proceso.

A nuestro asesor de tesis MSc. Mario Romero por guiarnos en este camino en el cual aprendimos mucho de él, y por guiarnos y darnos ánimos, a pesar de todas las dificultades que se nos presentaron.

A nuestras asesoras de área en microbiología Dra. Tania Ethel Cuadra Zelaya, MSc. Coralía de Los Ángeles González De Díaz y a MSc. Cecilia Haydee Gallardo de Velásquez directora general de procesos de graduación que a pesar de la problemática que surgió a raíz de la pandemia se tomaron el tiempo para la revisión y mejora del presente trabajo de graduación.

A todos los docentes que me forjaron como profesional a lo largo de los años, ya que sin ellos no sería la persona que soy ahora.

A todas las personas que nos brindaron su ayuda en este proceso.

Andrea Umanzor

DEDICATORIA

Dedico este logro primeramente a Dios porque me ha dado vida para llegar a culminar mi carrera universitaria.

A mis padres Regina Guadalupe de Umanzor y Joaquín Alfredo Umanzor porque gracias a ellos logré cumplir una más de mis metas.

A mis hermanos Diego José Umanzor, Jorge Umanzor, Jonathan Umanzor y Oscar Umanzor porque siempre me apoyaron.

A mi abuela Griselda Echeverría porque nunca dejó de creer en mí.

A mi familia por sus bendiciones y sus buenos deseos, por todo el apoyo que me han brindado a lo largo de los años.

A mis amigos Efraín Figueroa, Alex Gálvez y Josué Zaldaña porque siempre estuvieron ahí cuando necesitaba su apoyo tanto a nivel personal como profesional.

A todos los docentes que tuve a lo largo de la carrera y que me ayudaron a forjar mi carácter y a ser una profesional con moralidad y ética.

Andrea Umanzor

INDICE GENERAL

RESUMEN	
CAPITULO I	
1.0 INTRODUCCION	xxiii
CAPITULO II	
2.0 OBJETIVOS	
CAPITULO III	
3.0 MARCO TEORICO	28
3.1 GENERALIDADES DE <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Salmonella spp</i>	28
3.2 CIPROFLOXACINA GENERALIDADES, MECANISMO DE ACCIÓN Y DE RESISTENCIA	30
3.2.1 Espectro antimicrobiano	31
3.2.2 Resistencia a las quinolonas	32
3.3 RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN LA REGION LATINOAMERICANA	32
3.4 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE PROPÓLEOS	35
3.4.1 Propóleos en El Salvador	35
3.4.2 Propóleos composición físico-química y propiedades terapéuticas	37
3.4.3 Actividad Antimicrobiana de Propóleos.	38
3.4.4 Evaluación de la actividad antibacteriana <i>in vitro</i> de extractos hidroalcohólicos de propóleos.	38
3.5 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA POR EL METODO DE DIFUSIÓN EN AGAR	40

3.6 DETERMINACION DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA POR MICRODILUCIÓN	41
3.7 TÉCNICA DE TABLERO DE AJEDREZ EN MICROPLACA	42
3.7.1 Método en caldo	44
3.7.2 Inóculo	45
3.7.3 Definición del punto final	45
3.7.4 Interpretación de los resultados	46
3.8 CINETICA DE MUERTE	49
3.8.1 Dilución en solución salina	50
3.9 MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO	51
CAPITULO IV	
4.0 DISEÑO METODOLOGICO	54
4.1 TIPO DE ESTUDIO	54
4.2 INVESTIGACION BIBLIOGRAFICA	54
4.3 INVESTIGACION DE CAMPO	54
4.4 PARTE EXPERIMENTAL	55
4.4.1 Preparación del extracto hidroalcohólico de propóleos al 2% m/v	55
4.4.2 Cultivo de <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Salmonella enterica serovar Typhimurium</i>	56
4.4.3 Estandarización de inóculo de <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Salmonella enterica serovar Typhimurium</i> y verificación de su concentración mediante recuento en placa	56
4.4.4 Evaluación de la actividad antibacteriana de ciprofloxacina y el extracto hidroalcohólico de propóleos contra <i>Escherichia coli</i> ,	

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Salmonella enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i> mediante la técnica de difusión en agar	57
4.4.5 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria por Microdilución de <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Salmonella enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i>	58
4.4.6 Determinación del Efecto Antibiótico Mediante el Método de Tablero de Ajedrez por Microdilución	59
4.4.7 Cinética de Muerte	60
4.4.8 Microscopía Electrónica de Barrido	62
4.5 MODELO MATEMATICO	63
4.5.1 Interpretación de los resultados obtenidos en la determinación del efecto antibiótico mediante el método del tablero de ajedrez	63
CAPITULO V	
5.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS	68
5.1 Preparación de Extracto Hidroalcohólico de Propóleos al 2%	68
5.2 Evaluación de la actividad antibacteriana de ciprofloxacina y el extracto hidroalcohólico de propóleos contra <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Salmonella enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i> mediante la técnica de difusión en agar	68
5.3 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria por Microdilución de <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Salmonella enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i>	72
5.4 Determinación del Efecto Antibiótico Mediante el Método de Tablero de Ajedrez de <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> y <i>Salmonella enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i>	74
5.5 Cinética de Muerte	77

5.6 Microscopía Electrónica de Barrido	81
CAPITULO VI	
6.0 CONCLUSIONES	88
CAPITULO VII	
7.0 RECOMENDACIONES	91
BIBLIOGRAFIA	
GLOSARIO	
ANEXOS	

INDICE DE CUADROS

CUADRO N°	Pág. N°
1. Tipo de Interacción según el valor de CFI obtenido	66
2. Resultados del ensayo de CMI por microdilución	73
3. Resultados de cinética de muerte para <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	79
4. Resultados de cinética de muerte para <i>Salmonella enterica serovar Typhimurium</i> .	80

INDICE DE FIGURAS

FIGURA N°	Pág. N°
1. Esquema de la elaboración de la técnica del tablero de ajedrez	43
2. Estructuras de Resazurina azul no fluorescente, Resorufina rosado altamente fluorescente y Dihidroresorufina compuesto incoloro y no fluorescente	46
3. Representación de los resultados del tablero de ajedrez y su respectivo isoblograma	47
4. Disposición de la técnica de microgota en una placa de agar para el recuento de UFC/mL	50
5. Microscopio Electrónico de Barrido	52
6. Representación de resultados obtenidos en la determinación de la interacción antimicrobiana en el tablero de ajedrez A, B y C con sus respectivos isobogramas D, E y F	65
7. Extracto Hidroalcohólico de Propóleos Obtenido	68
8. Resultados del estudio de difusión en agar para A: <i>Escherichia coli</i> , B: <i>Pseudomonas aeruginosa</i> C: <i>Salmonella enterica serovar Typhimurium</i>	69
9. Concentraciones de extracto hidroalcohólico de propóleos y ciprofloxacina en la prueba de difusión en agar con sus respectivos halos de inhibición	70

10. Resultados del ensayo de CMI por Microdilución: α Ciprofloxacina β Amoxicilina λ Extracto Hidroalcohólico de Propóleos ε Control positivo de crecimiento Ω Control negativo	73
11. Resultado de la determinación del efecto antibiótico mediante el método de tablero de ajedrez de <i>Escherichia coli</i>	75
12. Resultado de la determinación del efecto antibiótico mediante el método de tablero de ajedrez de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	75
13. Resultado de la determinación del efecto antibiótico mediante el método de tablero de ajedrez de <i>Salmonella enterica serovar</i> <i>Typhimurium</i>	75
14. Isobogramas correspondientes a (A) <i>Escherichia coli</i> , (B) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (C) <i>Salmonella enterica serovar</i> <i>Typhimurium</i>	76
15. Representación gráfica de resultados obtenidos en ensayo de cinética de muerte para <i>Escherichia coli</i>	78
16. Representación gráfica de resultados obtenidos en ensayo de cinética de muerte para <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	79
17. Representación gráfica de resultados obtenidos en ensayo de cinética de muerte para <i>Salmonella enterica serovar Typhimurium</i>	81
18. Morfología de (A) <i>Escherichia coli</i> (B) en presencia de ciprofloxacina (C) extracto hidroalcohólico de propóleos y (D) mezcla	82

19. Morfología de (A) *Pseudomonas aeruginosa* (B) en presencia de ciprofloxacina (C) de extracto hidroalcohólico de propóleos y (D) mezcla 84
20. Morfología de (A) *Salmonella enterica serovar Typhimurium* (B) en presencia de ciprofloxacina (C) extracto hidroalcohólico de propóleos y (D) mezcla 85

INDICE DE TABLAS

Tabla N°	Pág. N°
1. Contenido de los tubos de microcentrífuga para la prueba de cinética de muerte	61

INDICE DE ANEXOS

ANEXO N°

1. Elucidación de los compuestos mayoritarios presentes en el propóleo de Chilanga Morazán, realizados por el Laboratorio de Elucidación de Estructuras Orgánicas de la Facultad de Química y Farmacia.
2. Listado de Material, Equipo, Reactivos y Medios de Cultivo utilizados.
3. Esquema de preparación del extracto hidroalcohólico de propóleos al 2% m/v.
4. Esquema del cultivo de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella enterica serovar Typhimurium*
5. Esquema de estandarización del inóculo de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella enterica serovar Typhimurium* y verificación de su concentración mediante recuento en placa.
6. Esquema de la evaluación de la actividad antibacteriana de ciprofloxacina y extracto hidroalcohólico de propóleos contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella enterica serovar Typhimurium* mediante la técnica de difusión en agar.
7. Esquema de la determinación de la concentración mínima inhibitoria por microdilución de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella enterica serovar Typhimurium*.

8. Esquema de la determinación del efecto antibiótico mediante el método de tablero de ajedrez.
9. Esquema de cinética de muerte.
10. Esquema de microscopía electrónica de barrido.
11. Procedimiento de la preparación del extracto hidroalcohólico de propóleos al 2% m/v.
12. Cuadros de resultados obtenidos de tablero de ajedrez.
13. Cuadros de resultados del ensayo de cinética de muerte.

ABREVIATURAS

ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Caldo Infusión Cerebro Corazón
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
CENSALUD	Centro de Investigación y Desarrollo en Salud
mL	Mililitro
OMS	Organización Mundial de la Salud
UFC	Unidades Formadoras de Colonia
UFC/mL	Unidades Formadoras de Colonia por Mililitro
µg/mL	Microgramos por Mililitro
FD	Factor de Dilución

RESUMEN

En la investigación realizada se estudió el efecto antibiótico de un extracto hidroalcohólico de propóleos y ciprofloxacina contra las cepas *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella enterica serovar Typhimurium*; en un período de tiempo de octubre de 2019 a marzo de 2020, en el laboratorio de control de calidad microbiológico de la Facultad de Química y Farmacia y CENSALUD de la Universidad de El Salvador; con la finalidad de conocer alternativas terapéuticas para la resolución de la problemática actual de resistencia antimicrobiana.

Para llevar a cabo este estudio se realizó la recolección y preparación del extracto hidroalcohólico de propóleos, se determinó su actividad antimicrobiana mediante el método de difusión en agar; posteriormente la CMI obteniendo resultados que nos permitieron realizar la técnica de tablero de ajedrez en la cual las cepas *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* presentaron interacción sinérgica; mientras que *Salmonella enterica serovar Typhimurium* mostró interacción de sumación. Mediante cinética de muerte se determinó que las tres cepas presentaron muerte microbiana en presencia de la mezcla de extracto hidroalcohólico de propóleos y ciprofloxacina; y con microscopía electrónica de barrido se visualizó el daño causado sobre la morfología bacteriana.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se determinó que el extracto hidroalcohólico de propóleos posee actividad antimicrobiana y en combinación con el antibiótico ensayado presentó en dos de las cepas evaluadas efecto sinérgico; el estudio de cinética de muerte demostró que las tres cepas presentaron muerte microbiana al ser expuestas a la mezcla en un tiempo determinado; constatando daño celular significativo mediante microscopía electrónica de barrido; sin embargo, es conveniente realizar estudios a diferentes propóleos de todo el país para evaluar su posible actividad antimicrobiana y utilizar otros modelos bacterianos de importancia clínica.

**CAPITULO I
INTRODUCCION**

1.0 INTRODUCCION

Escherichia coli forma parte de la microbiota intestinal del hombre e incidentalmente se convierte en patógeno; *Pseudomonas aeruginosa* puede provocar infecciones cuando el ser humano se encuentra frente a estados de inmunodepresión o por disminución de la microbiota intestinal protectora, debido al uso de antimicrobianos de amplio espectro o en pacientes expuestos al ambiente hospitalario; *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*, es uno de los principales agentes causales de intoxicaciones alimentarias a nivel mundial; la preocupación en el campo de la salud es combatir estos microorganismos de forma rápida y eficaz; sin embargo, en la actualidad con los diversos mecanismos de resistencia desarrollados por las bacterias frente a los antibióticos hace necesaria la búsqueda de otras alternativas terapéuticas.

La OMS emitió en febrero de 2017, una lista de las bacterias con resistencia antimicrobiana importante que amenazan la salud de la humanidad, necesitándose de la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas para su erradicación, en esta lista figuran las bacterias a utilizadas en este estudio *Pseudomonas aeruginosa*, bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*, entre las cuales se encuentra *Escherichia coli*, con prioridad crítica y *Salmonella spp.*, con prioridad elevada. En enero de 2018, emitió un comunicado sobre datos recientes que revelaron los altos niveles de resistencia a los antibióticos en todo el mundo, entre las bacterias más resistentes se encontraron *Escherichia coli* y *Salmonella spp.* Y en el año 2019, emitió un comunicado sobre la importancia de la resistencia a los antimicrobianos para la salud pública, en la cual se hace énfasis que la resistencia supone una limitación de las opciones terapéuticas, en este informe se mencionan algunas bacterias cuya resistencia es más preocupante desde el punto de vista de la salud pública, entre ellas: *Escherichia coli* adquirida en el medio extrahospitalario, *Pseudomonas aeruginosa* adquirida en el medio hospitalario y *Salmonella spp.* en la clasificación de bacterias zoonóticas.

En investigaciones previas de carácter internacional, se ha demostrado que los extractos hidroalcohólicos de propóleos poseen efecto antimicrobiano, dicha actividad se relaciona con la presencia de flavonoides y compuestos fenólicos, cabe mencionar que la composición de los propóleos varía según la zona geográfica de la cual han sido extraídos y es por ello que se planteó demostrar si un extracto hidroalcohólico de propóleos proveniente del departamento de Morazán, presenta esta actividad.

Debido a la problemática antes mencionada, se realizó el estudio del efecto antimicrobiano contra las cepas ATCC 8739, 9027 y 14028 de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella enterica serovar Typhimurium*, respectivamente; utilizando la combinación de ciprofloxacina y un extracto hidroalcohólico de propóleos, mediante la técnica del tablero de ajedrez por microdilución, presentando interacción de tipo sinérgica para *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* y de tipo sumación para *Salmonella enterica serovar Typhimurium*.

Posteriormente, se determinó en la cinética de muerte por la técnica de microgota, que se produjo muerte microbiana con la combinación antes mencionada en diferentes tiempos para las tres cepas y se evaluó el daño celular provocado sobre la morfología bacteriana utilizando microscopía electrónica de barrido, todo ello en un período de tiempo de octubre de 2019 a marzo de 2020, en el laboratorio de control de calidad microbiológico de la Facultad de Química y Farmacia y Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) de la Universidad de El Salvador.

CAPITULO II
OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto antibiótico de un extracto de propóleos y ciprofloxacina contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella enterica serovar Typhimurium*.

2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 2.2.1. Preparar un extracto hidroalcohólico de propóleos a partir de una muestra recolectada en la zona de Morazán.
- 2.2.2. Demostrar la actividad antibacteriana de ciprofloxacina y el extracto de propóleos contra cada una de las bacterias en estudio por la técnica de difusión en agar.
- 2.2.3. Establecer la concentración mínima inhibitoria por microdilución de ciprofloxacina y el extracto de propóleos frente a *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella enterica serovar Typhimurium*.
- 2.2.4. Determinar el efecto antibiótico entre la combinación de ciprofloxacina con el extracto de propóleos mediante la técnica del tablero de ajedrez.
- 2.2.5. Verificar la cinética de muerte resultante sobre las bacterias en estudio por la interacción entre ciprofloxacina y el extracto de propóleos.
- 2.2.6. Evidenciar el efecto de ciprofloxacina y el extracto de propóleos sobre la morfología de las bacterias en estudio mediante microscopía electrónica de barrido.

CAPITULO III
MARCO TEORICO

3.0 MARCO TEORICO

3.1 GENERALIDADES DE *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella spp.*

Escherichia coli

Es un bacilo gramnegativo, oxidasa negativa, con un tamaño promedio de 1.1-1.5 μm de ancho y 2.0-6.0 μm de largo. ⁽⁴⁵⁾ De acuerdo a sus requerimientos de oxígeno es anaerobio facultativo de la familia *Enterobacteriaceae*, esta bacteria coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento y se le considera un microorganismo que forma parte de la microbiota normal, pero existen cepas que pueden ser patógenas y causar daño produciendo diferentes cuadros clínicos, entre ellos diarrea.⁽⁴⁴⁾

Se distinguen dos grandes grupos de *Escherichia coli* patógenas según el tipo de infección que provocan. Un primer grupo está constituido por las cepas de *Escherichia coli* responsables de infecciones extraintestinales: en el tracto urinario, sepsis y meningitis neonatal, y un segundo grupo constituido por cepas patógenas intestinales, responsables de un elevado número de infecciones gastrointestinales.⁽⁴⁵⁾

En base a su mecanismo de patogenicidad y cuadro clínico, las cepas de *Escherichia coli* causantes de diarrea se clasifican en seis grupos: enterotoxigénica (ETEC), enterohemorrágica también conocidas como productoras de toxina vero o toxina semejante a shiga (EHEC o VTEC o STEC), enteroinvasiva (EIEC), enteropatógena (EPEC), enteroagregativa (EAEC) y de adherencia difusa (DAEC).⁽⁴⁴⁾

Pseudomonas aeruginosa

Es un patógeno ubicuo, oportunista y bastante persistente en el medio ambiente. Esta bacteria tiene forma de bastón aproximadamente de 0.5-1 μm en diámetro y

de 1.5-5 μm de largo. Cuenta con un flagelo polar que le confiere la motilidad necesaria. Se considera a esta especie como bacteria aerobia facultativa.⁽⁴¹⁾

Puede crecer entre 20 y 43°C, y al crecer en altas temperaturas se diferencia del resto de las otras especies de *Pseudomonas*. Se caracteriza por ser parte del grupo de microorganismos no fermentadores que tienen en común la incapacidad de fermentar lactosa, con la capacidad de utilizar fuentes de carbono y nitrógeno como acetato y amoníaco, obteniendo energía de la oxidación de azúcares.⁽⁴¹⁾

Tanto las capacidades para persistir en condiciones medio ambientales adversas como los mecanismos de patogenicidad que posee, han convertido a *Pseudomonas aeruginosa* en un principal microorganismo relacionado con las infecciones nosocomiales, responsable aproximadamente de 10 a 15% de las infecciones nosocomiales mundiales.⁽⁴¹⁾

Se le considera la quinta causa más frecuente en las infecciones en general a nivel mundial, la segunda causa de neumonía nosocomial, la tercera causa de infecciones urinarias, la cuarta causa de infecciones de sitio quirúrgico y la séptima causa responsable de sepsis. Este patógeno afecta principalmente a pacientes inmunocomprometidos.⁽⁴¹⁾

Salmonella spp.

El género *Salmonella* pertenece a la familia de las *Enterobacteriaceae*, es uno de los principales agentes causales de intoxicaciones alimentarias a nivel mundial, coloniza a la mayoría de los animales y el ser humano; está integrada por bacilos gramnegativos, anaerobios facultativos, no esporulados, generalmente móviles por flagelos peritricos que utilizan citrato como única fuente de carbono y poseen metabolismo de tipo oxidativo y fermentativo. Para su crecimiento no requieren cloruro de sodio, pero pueden crecer en concentraciones que van desde 0.4% al 4%.⁽²⁷⁾

La mayoría de los serotipos de *Salmonella* crecen en un rango de temperatura que va desde 5°C a 47°C, con una temperatura óptima de 35°C-37°C, algunas pueden llegar a crecer a 2°C o 4°C y hasta 54°C. El pH de crecimiento oscila entre 4-9 con un óptimo entre 6.5 y 7.5. Se desarrollan bien a una actividad de agua (aw) de 0.99 a 0.94, pueden llegar a sobrevivir en alimentos secos con un aw de <0.2. Su crecimiento se inhibe completamente a temperaturas inferiores a 7°C, pH <3.8 y un aw <0.94.⁽²⁷⁾

Se caracterizan por ser de amplia distribución, altamente patógenos y de difícil aislamiento, con más de 2500 serotipos identificados en el actual sistema de Kauffmann-White, siendo *Salmonella enterica serovar Typhimurium*, *Enteritidis* y *Newport* los serotipos más aislados en alimentos a nivel mundial.⁽²⁷⁾

3.2 CIPROFLOXACINA GENERALIDADES, MECANISMO DE ACCIÓN Y DE RESISTENCIA

Ciprofloxacina fue una de las primeras fluoroquinolonas. Se prescribe para tratar o prevenir determinadas infecciones bacterianas, teniendo amplio espectro de acción.⁽⁹⁾

Es una fluoroquinolona de segunda generación, por lo que tiene mayor actividad ante bacterias gramnegativas incluida *Pseudomonas aeruginosa*, también es activa contra algunos patógenos atípicos, tiene actividad moderada contra grampositivos y prácticamente nula frente a anaerobios.⁽⁹⁾

Las quinolonas o fluoroquinolonas son antibióticos bactericidas que actúan inhibiendo la síntesis del ADN bacteriano. Actúan en el ADN cromosómico bacteriano, uniéndose a algunas de las topoisomerasas e inhibiendo su acción. Las topoisomerasas son enzimas que participan en el proceso de síntesis del ADN, por desenrollamientos y enrollamientos del ADN cromosómico.⁽²⁾

En microorganismos gramnegativos, las topoisomerasas que inhiben principalmente es la ADN-girasa, que tiene una subunidad A y una subunidad B.

La función más importante de la ADN-girasa es mantener un nivel de enrollamiento del ADN que facilite el movimiento hacia los complejos que se forman en la replicación y la transcripción. También libera enrollamientos negativos en un proceso dependiente de ATP. En la girasa las quinolonas interaccionan con aminoácidos de las alfa-hélices cercanas a la tirosina del centro activo, que está implicado en la rotura del ADN. En grampositivos la principal diana es la topoisomerasa IV, que tiene dos subunidades, ParC y ParE. La topoisomerasa IV separa las hebras de ADN tras cada replicación. También tiene una actividad relajante sobre la cadena de ADN.⁽²⁾

Un paso importante en el mecanismo de acción de las quinolonas es la formación de un complejo quinolona-enzima-ADN que contiene ADN roto. La unión de una quinolona a la ADN-girasa provoca un cambio conformacional en el complejo girasa-ADN responsable de la inhibición de la enzima. La topoisomerasa IV formaría complejos similares a los que se forman con la girasa. Su acción sobre las topoisomerasas, aunque necesaria, no explica por sí sola su acción bactericida. Deben tener lugar acontecimientos posteriores, pero su mecanismo íntimo se desconoce.⁽²⁾

3.2.1 Espectro antimicrobiano

Las quinolonas se han dividido en cuatro generaciones sobre la base de su actividad antimicrobiana:

Los agentes de primera generación, que son usados muy poco actualmente, tienen moderada actividad contra microorganismos gramnegativos y una distribución sistémica mínima.⁽²⁾

Las quinolonas de segunda generación han ampliado la actividad contra microorganismos gramnegativos y contra agentes patógenos atípicos, pero tiene limitada acción contra grampositivos. Estos agentes son más activos contra los bacilos gramnegativos aeróbicos. La ciprofloxacina es la quinolona más activa contra *Pseudomonas aeruginosa*.⁽²⁾

Las quinolonas de tercera generación conservan la actividad contra gramnegativos y amplían su actividad contra bacterias intracelulares atípicas, además de mejorar la actividad contra grampositivos.⁽²⁾

Los agentes de cuarta generación mejoran la acción contra grampositivos, mantienen la cobertura de gramnegativos, y adquieren acción contra bacterias anaeróbicas.⁽²⁾

3.2.2 Resistencia a las quinolonas

La resistencia a quinolonas tiene mecanismos múltiples y un impacto clínico importante. Las mutaciones pueden ocurrir rápidamente durante la terapia con fluoroquinolonas y convertirse en el factor más importante que limite el uso de estos antimicrobianos.⁽²⁾

Los mecanismos de resistencia a las quinolonas se pueden resumir en tres principales:⁽²⁾

Mutación de la enzima. Se da por la producción de mutaciones cromosómicas que alteran la topoisomerasa del ADN bacteriano.

Alteración de la permeabilidad. Se presenta como una disminución de la permeabilidad bacteriana por alteración de las porinas (poros).

Bomba de eflujo. Por un mecanismo de eflujo, mediante el cual se excreta de manera activa a las quinolonas hacia el exterior bacteriano.

3.3 RESISTENCIA ANTIMICROBIANA EN LA REGION LATINOAMERICANA

La resistencia antimicrobiana genera mayor morbimortalidad, así como una elevación en los costos de salud, por lo cual es considerada un problema serio en todo el mundo. Los países en vías de desarrollo en general muestran niveles de resistencia mayores que en países industrializados y a su vez cuentan con menos recursos para el desarrollo de estrategias para su contención. Por lo tanto,

a pesar de que es un problema global, tiene mayores consecuencias en los países con menos recursos.⁽²³⁾

Escherichia coli

En Latinoamérica, cerca de 20% de las cepas de *Escherichia coli* de la comunidad son resistentes a fluoroquinolonas. Un hecho alarmante ha sido la descripción en los Estados Unidos y Europa de plásmidos que codifican multiresistencia transferible, denominados plásmidos qnr. Esta resistencia parece relacionarse con la inhibición de la unión de la quinolona al ADN girasa, dando lugar a CMI muy elevadas cuando este mecanismo se asocia a bacterias deficientes en porinas.⁽¹¹⁾

Pseudomonas aeruginosa

Las bacterias no fermentadoras entre las que se encuentra *Pseudomonas aeruginosa* son causa frecuente de infecciones severas adquiridas en el hospital como la neumonía asociada al ventilador y bacteriemia.⁽²³⁾

Pseudomonas aeruginosa es intrínsecamente resistente a varios antimicrobianos, pero además ha adquirido resistencia a penicilinas anti-*pseudomonas*, ceftazidima, carbapenemes, aminoglucósidos y ciprofloxacina.⁽²³⁾

Presenta múltiples mecanismos de resistencia como son: adquisición de lactamasas transferibles, impermeabilidad de la membrana externa, modificación del blanco del antimicrobiano y sobreproducción de las bombas de eflujo. Se han analizado 113 aislamientos de *Pseudomonas aeruginosa* obtenidos de hemocultivos de varios hospitales de Lima, encontrándose que 59% de las cepas eran multidrogoresistentes (MDR), resistentes a los antimicrobianos: ciprofloxacina, imipenem, amikacina y ceftazidima.⁽²³⁾

La resistencia de las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* a fluoroquinolonas es muy alta en la mayoría de países latinoamericanos y se debe a mutaciones del gen *gyr A*, topoisomerasa tipo IV: par C o los sistemas de eflujo. En América Latina, la resistencia de esta bacteria a ciprofloxacina sobrepasa de 70% en algunos centros hospitalarios.⁽¹¹⁾

Salmonella no typhi

Salmonella no-typhi (SNT) causa diarrea autolimitada en pacientes inmunocompetentes pero puede causar enfermedad invasiva en infantes malnutridos, ancianos y adultos inmunocomprometidos.⁽²³⁾

La ciprofloxacina se ha convertido en el tratamiento de elección de las infecciones causadas por SNT. Las fluoroquinolonas son alternativas eficientes en el tratamiento de estas infecciones en virtud de su actividad intrínseca en la familia *Enterobacteriaceae*. Sin embargo, varios estudios mostraron que las infecciones por *Salmonella typhi* no respondían al tratamiento con ciprofloxacina cuando aparentemente eran susceptibles a ésta *in vitro*, a este fenómeno se le llamó "susceptibilidad disminuida a la ciprofloxacina" y se define cuando el nivel de CMI a ciprofloxacina es mayor a $> 0,125 \mu\text{g/mL}$.⁽²³⁾

La mayoría de aislamientos con susceptibilidad disminuida a ciprofloxacina son resistentes a ácido nalidíxico, por lo cual la resistencia a este último puede usarse como predictor de susceptibilidad disminuida a ciprofloxacina. Este mismo fenómeno se ha descrito en *Salmonella no typhi*.⁽²³⁾

Los mecanismos de resistencia están determinados por la presencia de mutaciones a nivel del sitio blanco de las quinolonas, la ADN girasa, es decir, en la región determinante de la resistencia a quinolonas de la subunidad A; y de la topoisomerasa IV.⁽²³⁾

A nivel latinoamericano no se conoce exactamente el grado de resistencia adquirido por *Salmonella spp.*, sólo se conoce que es una cepa que ha adquirido resistencia a ciprofloxacina, especialmente *Salmonella Typhimurium* se ha convertido en una cepa multirresistente, destacando que en humanos los serotipos de *Salmonella* que más rápido adquieren resistencia son: *Salmonella Typhimurium* y *Salmonella Enteritidis*.⁽⁴³⁾

3.4 ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE PROPÓLEOS

El término “propóleos”, proviene del griego “propolis”: pro: delante o en defensa de y polis: ciudad; es decir: “delante o en defensa de la ciudad. Los propóleos son un conjunto de sustancias resinosas, gomosas y balsámicas de consistencia variable, recogidas y procesadas por las abejas melíferas de algunas especies vegetales. Este material es utilizado para sellar las hendiduras de las paredes de la colmena, o incluso para sellar orificios; debido a sus propiedades evita la entrada de otros insectos y combate algunos microorganismos.⁽¹⁴⁾

Los propóleos son una mezcla de consistencia resinosa que son producidos por las abejas al combinar resinas de origen vegetal con cera, enzimas salivares propias de las abejas, entre otros. La composición de propóleos varía según su origen botánico, de la variedad de la abeja, de la época y de las técnicas de recolección.⁽⁵²⁾

Existen varias técnicas para recolectar propóleos, destacándose el método de raspado y la utilización de mallas plásticas. Las características geográficas y botánicas de las zonas donde se extrae propóleos, determinan en gran medida su calidad, ya que existe una relación entre los componentes de la planta con algunas propiedades físicas como el color, sabor, textura y punto de fusión.⁽⁵²⁾

3.4.1 Propóleos en El Salvador

El Salvador es uno de los países con mayor producción apícola en Centroamérica. La apicultura es un rubro que permite obtener ingresos y

alimentos de buena calidad a los pequeños productores en áreas rurales. Los propóleos son productos sin explotar en la apicultura salvadoreña. A nivel nacional se estima que existen unas 68,903 colmenas en 2,051 apiarios con una producción de 1,401,858 botellas de miel y 112,925 libras de cera, generando empleo directo a más de 1,070 productores, realizando una demanda de 849 puestos de trabajo, según el último Censo Agropecuario del 2007.⁽⁶⁾

En el país los volúmenes de propóleos producidos son escasos, dado que la mayoría de apicultores por desconocimiento de los beneficios propios de este producto y sus invaluable características, toman los propóleos como un problema más para la limpieza de los equipos de la colmena, éste en la mayoría de los casos se elimina. En entrevistas realizadas con apicultores mencionan que no recolectan propóleos debido a la falta de información sobre los métodos de recolección, manejo, almacenamiento, proceso y mercado del mismo.⁽⁶⁾

También hay que destacar que falta de caracterización de propóleos de El Salvador, hacen que los precios no sean competitivos, frente a propóleos bien estudiados y caracterizados como por ejemplo los propóleos brasileños.⁽⁶⁾

En el país existen algunas industrias en desarrollo en procesamiento de propóleos como: Natural Maximun, Mielles Joyas de Cerén, Apiarios Vides Silvas, Mielles Juan Pastor, Vapes S.A. DE C.V. entre otros apicultores que lo procesan artesanalmente en sus apiarios.⁽⁶⁾

El éxito tanto en calidad como en cantidad de propóleos obtenido depende de una interrelación de factores que juegan un papel fundamental como es el clima y flora, debido a que los propóleos son un material elaborado a partir de los tejidos y exudados de diferentes plantas, su origen geográfico influye en su composición, debido a que las fuentes vegetales varían de acuerdo con la latitud y los pisos térmicos. Además, la producción de propóleos está estrechamente relacionado con las razas de las abejas, siendo la raza caucásica y los híbridos africanizados de *Apis mellifera*, los más propolizadores que otras razas, potenciándose este

comportamiento cuando los apiarios se ubican a más de 1000 metros de altitud. También, un método de recolección adecuado acelera la producción y mejora la calidad de los propóleos.⁽⁶⁾

En El Salvador no se han realizado estudios que reporten la composición química de los propóleos, sólo se reporta la identificación de sustancias como cera y ácidos fenólicos.

3.4.2 Propóleos composición físico-química y propiedades terapéuticas

El propóleos es sustancia de color pardo rojizo o amarillo verdoso que tiende a oscurecerse, en cuanto a sus características organolépticas tiene sabor acre, amargo y olor agradable, al ser sometido a un proceso de combustión este compuesto libera una fragancia de resinas aromáticas.⁽³⁷⁾

En cuanto a la composición del propóleos se tiene conocimiento de alrededor de unas 150 sustancias; entre estas sustancias se pueden mencionar resinas y bálsamos aromáticos en un 50 y 78%, aceites esenciales y otras sustancias volátiles de un 4.5% a un 15%, ceras de un 12% a un 15%, impurezas mecánicas en menos de 15% y polen, los más importantes son los polifenoles.⁽³⁷⁾

Contiene flavonoides: Acacetina, crisina amarilla, pectolinarigenina, tectocricina, galangina, pinoembrina, izalquinina, quercetina, pinostrobina y sakuranetina. Ácidos orgánicos: Ácido benzoico y ácido gálico. Ácidos fenólicos: éster fenílico del ácido cafeico, cinámico, fenílico insofenílico, ácido p-cumarínico, ácido ferúlico. Aldehídos aromáticos: Vainillina, isovainillina. Cumarinas: esculetol, escopoletol. Ácidos grasos: ácidos undecanoico, neurónido y ácidos insaturados. Minerales: aluminio, plata, bario, boro, cobalto, cobre, estaño, hierro, magnesio, manganeso, níquel, plomo, selenio, silicio, titanio, vanadio, molibdeno y zinc. Vitaminas: Se han encontrado cantidades variables de vitamina A, B1, B2, B6, C, E, ácido nicotínico y ácido pantoténico.⁽³⁷⁾

Contiene además carbohidratos, polisacáridos y otros compuestos. Los compuestos fenólicos constituyen más de un 50% del peso total, 14 ácidos carbónicos, los más importantes son ácidos grasos polinsaturados y el ácido linólico.⁽³⁷⁾

En cuanto a las propiedades terapéuticas que poseen los propóleos se mencionan: antibacteriano, cicatrizante de heridas sépticas, antiinflamatorio, antiviral, antioxidante, inmunomodulador y antiasmático.⁽³⁷⁾

3.4.3 Actividad Antimicrobiana de Propóleos.

El uso de propóleos para fines curativos no es reciente, ya que en las civilizaciones del antiguo Egipto y en Grecia se conocían sus propiedades antisépticas y cicatrizantes y, por ello lo utilizaban en aplicaciones para combatir numerosas enfermedades. Así, Múltiples estudios bacteriológicos han confirmado su acción bacteriostática y bactericida.⁽⁶²⁾

3.4.4 Evaluación de la actividad antibacteriana *in vitro* de extractos hidroalcohólicos de propóleos.

Múltiples reportes indican que los propóleos son relativamente no tóxicos y tienen diversos efectos sobre bacterias, hongos, parásitos y virus. Estudios científicos de propóleos han permitido descifrar su compleja composición y se han entendido nuevos mecanismos de su actividad biológica, que permiten su empleo en diversos campos como en la industria farmacéutica, la medicina, la biología y a nivel industrial, ya que exhibe un amplio espectro de acciones terapéuticas, destacando la actividad antibiótica, antiviral y antiinflamatoria.⁽⁴⁹⁾

El contenido de ceras en porcentajes altos, es una característica indeseable ya que limita la presencia de aquellas fracciones de interés farmacológico como los compuestos fenólicos. Cuanto mayor sea la proporción de las resinas solubles en etanol en el propóleos, mejor será en términos de rendimiento, debido a que en las resinas se encuentran los compuestos que le confieren propiedades anti fúngicas, antivirales y antibacterianas.⁽⁴⁹⁾

En cuanto al mecanismo de acción de los propóleos se conoce que los flavonoides presentes en los mismos, poseen una acción directa sobre las membranas de algunas bacterias, reduciendo su capacidad de permeabilidad y haciéndola más frágil.⁽⁴⁹⁾

Las propiedades antimicrobianas de extractos hidroalcohólicos de propóleos obtenidos de abejas *Apis mellifera*, se atribuye a los flavonoides galangina y pinocembrina y derivados de los ácidos: benzoico, ferúlico y cafeico.⁽⁴⁹⁾

El ácido cinámico y algunos flavonoides desactivan la energía de la membrana citoplasmática, inhibiendo la motilidad bacteriana, haciéndolas más vulnerables al ataque del sistema inmunológico y potenciando los antibióticos.⁽⁴⁹⁾

Los propóleos pueden retardar el desarrollo de la formación de biopelículas en diferentes grupos microbianos incluyendo: *Listeria spp.*, *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Bacillus spp.*, *Escherichia coli* y especies de *Pseudomonas*.⁽⁴⁹⁾

Se ha estudiado una tintura de propóleos comercial al 70% que es efectiva contra bacterias enteropatógenas; entre ellas *Escherichia coli* y *Salmonella spp.* demostrándose que la tintura de propóleos tiene efecto antimicrobiano *in vitro* en las cepas estudiadas y que el etanol presente como solvente no es el responsable de tal efecto. *Salmonella paratyphi* fue la única cepa en la que se evidenció un efecto bactericida, obteniéndose en las demás cepas de *Salmonella spp.* y *Escherichia coli* un efecto bacteriostático. De acuerdo con los resultados obtenidos, se puede analizar que el propóleos utilizado es de alta efectividad, ya que posee actividad bacteriostática y bactericida sobre bacterias gramnegativas, lo cual es un hallazgo importante debido a que propóleos de algunos países sólo son efectivos contra bacterias grampositivas.⁽²⁵⁾

Se ha evaluado el efecto de un extracto etanólico de propóleos comercial al 60% sobre *Pseudomonas aeruginosa* el cual es considerado un microorganismo con

gran capacidad para formar biopelículas y bajo este estado (sésil) se incrementa considerablemente la resistencia antimicrobiana en comparación con el estado planctónico, siendo ésta una característica clínicamente importante; esto explica la falla usual de los antimicrobianos en infecciones que cursan con formación de biopelículas, aun cuando las pruebas de laboratorio demuestren sensibilidad a los antibióticos utilizados. Obteniendo como resultado que el extracto etanólico de propóleos posee actividad bactericida a una concentración relativamente baja contra la forma planctónica de esta bacteria, lo cual indica que presenta una alta efectividad contra bacterias gramnegativas, sin embargo, no fue eficaz en la erradicación de esta bacteria en estado sésil.⁽²⁴⁾

3.5 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA POR EL MÉTODO DE DIFUSIÓN EN AGAR

Agar Mueller-Hinton es el medio recomendado de rutina para la difusión en agar, por el rápido crecimiento de bacterias patógenas aerobias y anaerobias facultativas. El enfoque de dilución en agar para las pruebas de susceptibilidad está bien estandarizado y es reproducible y puede utilizarse como método de referencia en la evaluación de otros métodos de dilución.⁽³⁰⁾

En este método, existen 2 formas de identificar la difusión y, por lo tanto, la efectividad del antimicrobiano. En la primera, el agar solidificado se inocula con la suspensión requerida del microorganismo; en la cual un papel filtro es inoculado con una solución de concentración conocida del antimicrobiano y es colocado en la superficie del agar. En la segunda, se perfora el agar solidificado y previamente inoculado, utilizando un perforador estéril, y se vierte una solución de cierta concentración del antimicrobiano en las perforaciones.⁽⁴²⁾

Posteriormente, las placas petri son incubadas a la temperatura y tiempo óptimos, el principio es la difusión del antimicrobiano hacia todo el agar, lo que conduce a la inhibición del crecimiento bacteriano mediante la formación de zonas de inhibición.⁽⁴²⁾

Los resultados de la prueba de difusión en agar son generalmente cualitativos. La susceptibilidad del microorganismo de prueba está relacionada con el tamaño de la zona de inhibición en milímetros.⁽⁴²⁾

Los microorganismos se denominan susceptibles cuando el diámetro de la zona es > a 30-35 mm, susceptibilidad intermedia cuando el diámetro de la zona varía entre 20-30 mm o resistentes cuyo diámetro es < a 15-20 mm.⁽⁴²⁾

3.6 DETERMINACION DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA POR MICRODILUCIÓN

Las técnicas de dilución en caldo o agar, se pueden utilizar para medir cuantitativamente la actividad *in vitro* de un antimicrobiano frente a un microorganismo. Estos métodos se basan en la preparación de una serie de tubos o placas con caldo o agar, respectivamente, a los cuales se les agrega el antibiótico en concentraciones crecientes, para luego inocular cada uno de los tubos o placas con una suspensión estandarizada del microorganismo en estudio, posteriormente se incuban y se determina la concentración mínima inhibitoria (CMI) del antimicrobiano frente al microorganismo ensayado.⁽¹⁶⁾

La microdilución, utiliza la misma metodología que la técnica de dilución con la ventaja de que implica el uso de pequeños volúmenes de caldo dispensado en bandejas de microdilución plásticas estériles, que tienen pocillos de fondo redondo o cónico. Cada pocillo debe contener caldo, el microorganismo inoculado y el antimicrobiano en estudio, el tiempo de incubación para la mayoría de los microorganismos es de 16 a 20 horas y la temperatura es 35 ± 2 °C y para evitar la desecación durante la incubación, se debe sellar cada bandeja de microtitulación con una tapa plástica o película plástica autoadhesiva, debido a las ventajas mencionadas se utilizará esta técnica en este estudio.⁽¹⁶⁾

La CMI es la concentración más baja de agente antimicrobiano que inhibe completamente el crecimiento del microorganismo en los tubos o pocillos de microdilución según lo detectado por el ojo humano.⁽¹⁷⁾

El volumen final de la prueba define si el método se denomina de dilución (utiliza tubos con un volumen total de 1-10 mL) o de microdilución (se realiza en placas de pocillos utilizando un máximo de 500 µL por pocillo). Posterior a la incubación, la presencia de turbidez o sedimentación indica crecimiento del microorganismo. Finalmente, para rectificar la inhibición, se toman alícuotas de los tubos o pocillos sin turbidez y se hace una siembra en agar.⁽⁴²⁾

Existe una clasificación de resultados para CMI, según Wang YC. (2014) con lo cual se pueden obtener los siguientes resultados: actividad fuerte CMI <10 µg/mL, actividad fuerte a moderada CMI entre 10-100 µg/mL, actividad débil a moderada CMI entre 100-1000 µg/mL, actividad débil CMI >1000 µg/mL.⁽⁵⁴⁾

3.7 TÉCNICA DE TABLERO DE AJEDREZ EN MICROPLACA

El método del tablero de ajedrez es la técnica que ha sido utilizada más frecuentemente para evaluar combinaciones antimicrobianas *in vitro*, debido a que posee ciertas ventajas, entre las cuales se pueden mencionar:⁽⁴⁰⁾

- Razonamiento fácil de entender.
- La matemática necesaria para calcular e interpretar los resultados es básica.
- Puede ser realizado en laboratorios microbiológicos utilizando equipo de fácil acceso.
- Ha sido la técnica utilizada con más frecuencia en estudios que han sugerido una ventaja de terapia sinérgica.

El término “tablero de ajedrez” se refiere al modelo formado ya sea utilizando tubos, pocillos de microtitulación o placas de agar, en los cuales se realizan diluciones múltiples de los dos antimicrobianos que están siendo estudiados, en

concentraciones iguales, arriba y debajo de sus concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) contra los organismos que están siendo ensayados.⁽⁴⁰⁾

Las concentraciones ensayadas para cada antimicrobiano van en un rango de cuatro a cinco diluciones por debajo de la CMI esperada al doble de la CMI prevista, utilizando diluciones dobles de cada antimicrobiano. También se incluye una fila o columna de tubos o pocillos de cada antimicrobiano sin adicionarle ninguna cantidad del otro antimicrobiano.⁽⁴⁰⁾

Así, el tablero de ajedrez consiste en columnas en las cuales cada tubo o pocillo contiene la misma cantidad del antimicrobiano A, diluido a lo largo del eje x y filas en las cuales cada tubo o pocillo contiene la misma cantidad del antimicrobiano B siendo diluido a lo largo del eje y.⁽⁴⁰⁾ (Ver Figura N°1).

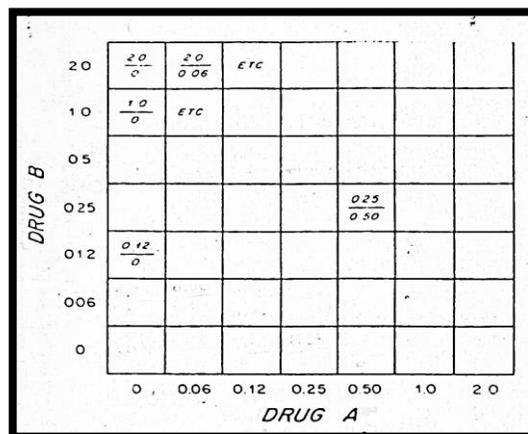


Figura N° 1. Esquema de la elaboración de la técnica del tablero de ajedrez.

El resultado es que cada casilla en el tablero de ajedrez, la cual representa un tubo o pocillo, contenga una única combinación de los dos antimicrobianos en estudio. Las diluciones de los antimicrobianos que están siendo ensayados son realizadas usualmente en caldo Mueller-Hinton o en otro caldo apropiado para estudios bacterianos, así las soluciones que contienen el antimicrobiano pueden

ser mezcladas con medio libre de éste para producir las concentraciones finales designadas en el diagrama.⁽⁴⁰⁾

Esta técnica puede ser realizada con ciertas modificaciones entre las cuales se pueden mencionar: en medio líquido o semisólido, con bandejas de microtitulación en lugar de una serie de tubos de ensayo, utilizando otras diluciones que no sean dobles, utilizando más de dos antimicrobianos y con organismos diferentes a las bacterias.⁽⁴⁰⁾

En esta investigación se realizó el ensayo mediante el uso de bandejas de microtitulación, como una modificación del tablero de ajedrez ya que se requieren grandes cantidades de antimicrobianos y medio para las pruebas de tablero de ajedrez estándar con tubos de ensayo, conteniendo las mezclas de caldo con los antimicrobianos que están siendo evaluados, por ende, se prefiere utilizar bandejas de microtitulación porque la modificación requiere emplear cantidades más pequeñas.

3.7.1 Método en caldo

Con tubos de ensayo es conveniente utilizar un volumen final de 1.0 mL en cada uno y llenarlos de la siguiente manera 0.5 mL de caldo conteniendo los antimicrobianos (0.25 mL de caldo para cada uno, si dos antimicrobianos están siendo evaluados) y 0.5 mL de caldo conteniendo una suspensión del microorganismo en estudio. Debido a que el volumen final (1.0 mL) es cuatro veces mayor que el volumen de caldo para cada antimicrobiano (0.25 mL) con este método, las concentraciones de antimicrobianos utilizadas en las soluciones iniciales deben ser cuatro veces mayores que las concentraciones finales deseadas. Por ejemplo, si la CMI del antimicrobiano A es 1.0 µg/mL, la concentración del antimicrobiano A en la solución añadida a los tubos en la columna de la derecha de la figura (Ver figura N°1) debería ser 8.0 µg/mL para producir una concentración final de 2.0 µg/mL, la cual es dos veces la CMI del microorganismo en estudio. De manera similar, el inóculo de la suspensión

bacteriana añadida a cada tubo en 0.5 mL de caldo, debería ser aproximadamente 2×10^5 UFC/mL después de la adición de un volumen igual de las soluciones que contienen los antimicrobianos.⁽⁴⁰⁾

Con una serie de soluciones antimicrobianas que contienen cuatro veces las concentraciones finales deseadas, se puede producir el rango deseado de concentraciones, en lugar de hacer series separadas de diluciones para cada tubo, la mayoría de los analistas encuentran más conveniente preparar grandes volúmenes de las soluciones de trabajo de los antimicrobianos en estudio y agregar una alícuota de estas soluciones a cada tubo o pocillo en la fila o columna apropiada.⁽⁴⁰⁾

Aunque las diluciones utilizadas en el tablero de ajedrez son exponenciales (en potencias de 2), los resultados son interpretados por el patrón que forman en un isoblograma, el cual convierte estos datos de escala exponencial a escala aritmética.⁽⁴⁰⁾

3.7.2 Inóculo

Usar el inóculo correcto es crítico para la exactitud y reproducibilidad en la técnica del tablero de ajedrez, como lo es para los otros métodos de medición de susceptibilidad.⁽⁴⁰⁾

Para la mayoría de los estudios bacterianos, el inóculo puede ser estandarizado igualando la turbidez del cultivo al estándar de 0.5 McFarland. Esto produce una suspensión de aproximadamente 10^8 UFC/mL para la mayoría de las bacterias, la cual luego se diluye en caldo fresco para alcanzar un inóculo final con una concentración de aproximadamente 10^5 UFC/mL.⁽⁴⁰⁾

3.7.3 Definición del punto final

La mayoría de las pruebas de tablero de ajedrez son leídas mediante la examinación de los tubos, placas o pocillos, buscando evidencia de crecimiento visible, después de 16 a 20 horas de incubación a 35°C-37°C. Ocasionalmente,

el punto final puede ser determinado en menor tiempo en pruebas que utilizan microorganismos de crecimiento rápido, o pueden requerirse de períodos más largos de incubación para los microorganismos de crecimiento lento.⁽⁴⁰⁾

El crecimiento microbiano es visualizado luego de dos horas de incubación al agregar resazurina, la cual funciona como indicador de viabilidad celular, útil para monitorear la proliferación celular y la citotoxicidad.⁽⁴⁰⁾

En particular, este colorante azul no fluorescente se reduce en dos pasos, irreversiblemente a resorufina: rosado altamente fluorescente, y en una segunda etapa reversible, a dihidroresorufina, compuesto incoloro y no fluorescente, procesos que se asocian principalmente con la mitocondria de las células viables. (Ver Figura N°2). La resazurina es difundida al medio permitiendo el continuo monitoreo de la proliferación y/o muerte celular.⁽²¹⁾

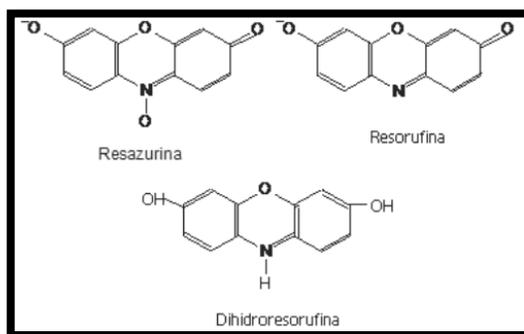


Figura N° 2. Estructuras de Resazurina azul no fluorescente, Resorufina rosado altamente fluorescente y Dihidroresorufina compuesto incoloro y no fluorescente.

3.7.4 Interpretación de los resultados

Al finalizar el tiempo de incubación y haber colocado el indicador de crecimiento, se obtendrán una serie de datos de las concentraciones en las cuales hay inhibición del crecimiento microbiano, a partir de las cuales se construye el isoblograma para la interpretación de los resultados y luego se calcula la

concentración fraccional inhibitoria como una reafirmación del resultado del isoblograma.⁽²⁰⁾

El isoblograma se construye de la siguiente manera, la concentración más baja del antimicrobiano que inhibe el crecimiento a lo largo del eje x, se grafica como coordenada en el eje x y la concentración más baja del antimicrobiano diluido a lo largo del eje y, que inhibe el crecimiento en la columna de tubos es tomada como la coordenada del eje y. El isoblograma es construido conectando las series de coordenadas generadas para cada combinación de antimicrobianos, formando el paso límite entre la inhibición y el crecimiento en el tablero de ajedrez.⁽²⁰⁾

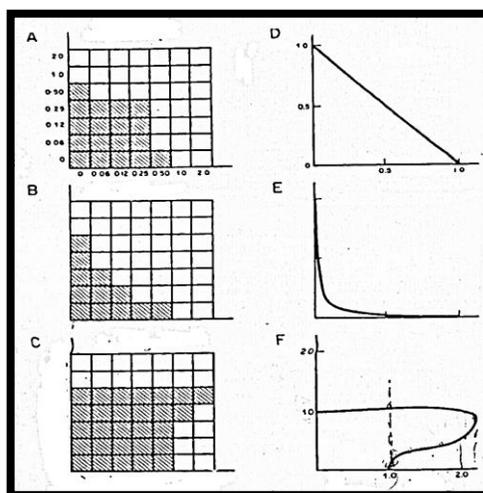


Figura N° 3. Representación de los resultados del tablero de ajedrez y su respectivo isoblograma.

En la figura N°3, se muestran los resultados experimentales, el área sombreada indica crecimiento visible, en el primer ensayo (A) se muestra un efecto de sumación, en el segundo (B) sinergismo y en el tercero (C) antagonismo con sus respectivos isoblogramas D, E y F.

Es importante conocer las definiciones de estos resultados las cuales se mencionan a continuación, el efecto de sumación de la combinación es igual a la

suma de las actividades de dos antimicrobianos que actúan por separado; la indiferencia sugiere que el efecto combinado de los fármacos que no interactúan uno con el otro debería ser simplemente, el efecto del fármaco más activo; el sinergismo indica que la actividad conjunta de los dos antimicrobianos es mayor que la suma de las actividades de ambos por separado y el efecto contrario al sinergismo, es el antagonismo, cuya actividad presentada por dos antimicrobianos juntos es significativamente menor que la suma de las actividades de los dos antimicrobianos cuando actúan separados.⁽²⁰⁾

La concentración fraccional inhibitoria (CFI) puede verse como una reafirmación matemática del isoblograma y es el método comúnmente usado en la literatura para reportar los resultados de los estudios conteniendo combinaciones antimicrobianas. En este método, la CFI para cada antimicrobiano se deriva de la división de la concentración del antimicrobiano necesaria para inhibir el crecimiento en una fila o columna dada por la CMI del microorganismo de prueba para ese antimicrobiano. La CFI es entonces calculada por la suma de las CFI por separado para cada uno de los antimicrobianos presentes en el tubo o pocillo.⁽⁴⁰⁾

$$CFI_A = \frac{CMI_A \text{ en presencia de B}}{CMI_A} \quad CFI_B = \frac{CMI_B \text{ en presencia de A}}{CMI_B}$$

$$CFI = \sum CFI_A + CFI_B$$

Aunque en cada tablero de ajedrez el antimicrobiano produce una serie de valores de CFI, si uno calcula la CFI por separado para cada fila o columna en el isoblograma, la mayoría de los analistas usan el valor obtenido para concentraciones igualmente efectivas de los dos antimicrobianos que se están probando como representativas de esa combinación. Aunque este enfoque simplifica los cálculos que pueden ser engañosos porque las proporciones de los

dos antimicrobianos, pueden no permanecer constantes *in vivo*, incluso si se administran en dosis proporcionales a sus CMI.⁽⁴⁰⁾

Existen diferentes valores para la interpretación del resultado de concentración fraccional inhibitoria, obteniéndose los siguientes criterios: Sinergismo cuando $\sum CFI \leq 0.5$, Adición o Sumación $> 0.5 \sum CFI \leq 1$, Indiferencia $> 1 \sum CFI \leq 4$ y Antagonismo $\sum CFI > 4$.^{(30) (49)}

3.8 CINÉTICA DE MUERTE

En contraste a la técnica del “Tablero de Ajedrez”, la cual típicamente provee solo datos inhibitorios, la técnica de “Cinética o Curva de Muerte” mide la actividad bactericida de la combinación que está siendo estudiada. Otra ventaja de la curva de muerte sobre la técnica del tablero de ajedrez es que provee una imagen dinámica de la acción antimicrobiana y de la interacción a lo largo del tiempo ya que se realizan una serie de recuentos de colonias, lo opuesto a la técnica del tablero de ajedrez la cual es usualmente examinada una sola vez después de 16 a 24 horas de incubación.⁽⁴⁰⁾

Los estudios de la cinética de muerte deben ser realizados en medio líquido y es requerido mucho cuidado para evitar su contaminación. La mayoría de los experimentos son realizados con un inóculo final de 10^5 a 10^7 UFC/mL, el cual es producido por la dilución de un cultivo del patógeno en caldo Mueller-Hinton o en otro caldo adecuado.⁽⁴⁰⁾

Es usualmente conveniente primero ajustar el cultivo para igualarlo a la escala estándar 0.5 McFarland y luego diluirlo una segunda vez con caldo fresco y las cantidades apropiadas de los antimicrobianos en el tubo o frasco en el cual el estudio será realizado. El recuento inicial debe realizarse tan pronto como se agregue el inóculo, dentro de los primeros 5 minutos. Asumiendo que el volumen del cultivo es al menos 10 mL, es usualmente conveniente tomar muestras de 0.5 mL para el recuento de colonias. Si el tiempo de muestreo es en intervalos de

tiempo cortos, los frascos conteniendo el cultivo deben ser regresados al incubador inmediatamente después de que las alícuotas sean tomadas.⁽⁴¹⁾

3.8.1 Dilución en solución salina

Como se realiza usualmente, este método utiliza una serie de tubos conteniendo 4.5 mL de solución salina estéril (0.9% NaCl) o de otro diluyente estéril apropiado conteniendo la mezcla de antimicrobianos. Se pipetea una muestra de 0.5 mL del cultivo al primer tubo, produciéndose la dilución 10^{-1} , y luego después de un mezclado completo, se transfieren 0.5 mL de este tubo, produciendo la dilución 10^{-2} , repitiendo el procedimiento hasta preparar una serie de diluciones, usualmente se trabaja de 10^{-1} a 10^{-8} .⁽⁴⁰⁾

Alícuotas precisas de estos tubos son luego inoculadas en placas de agar sin antimicrobianos e incubadas durante 12 horas o por más tiempo. Si se usan alícuotas de 0.1 mL deberían ser extendidas en la superficie de toda la placa de agar. Sin embargo, si volúmenes más pequeños son utilizados, por ejemplo: en el método de microgota se colocan alícuotas de $0.010 \text{ mL} \equiv 10 \mu\text{L}$, por lo cual es a menudo factible utilizar una sola placa de agar para los resultados de todas las diluciones, esté último método mencionado será utilizado en el estudio, debido a la ventaja que supone de utilizar una sola placa de agar como se muestra en la figura siguiente.⁽⁴⁰⁾ (Ver figura N°4)

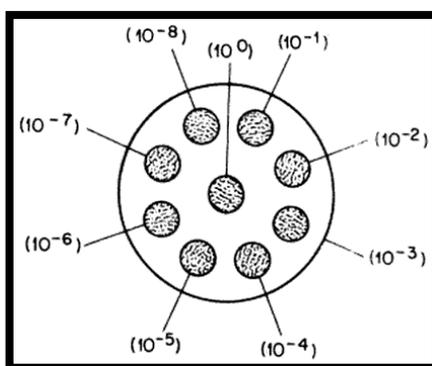


Figura N° 4. Disposición de la técnica de microgota en una placa de agar para el recuento de UFC/mL.

Las réplicas de los recuentos de colonias obtenidos de esta manera deben coincidir dentro de $\pm 10\%$. En contraste, diferencias significativas entre antimicrobianos y las combinaciones antimicrobianas son usualmente definidas como 10 veces a 100 veces el cambio en el número de UFC/mL después de 4 a 24 horas de incubación. Si se espera que el recuento de colonias sea cercano a cero, es de mucha ayuda colocar una alícuota sin diluir de la muestra en el centro de la placa, con el método de microgota, o utilizar una placa de agar extra con 0.1m L de material sin diluir.⁽⁴⁰⁾

3.9 MICROSCOPIA ELECTRONICA DE BARRIDO

El microscopio electrónico de barrido es un instrumento muy versátil, permite la observación y caracterización superficial de materiales orgánicos e inorgánicos, brindando información morfológica y de composición química rápida, eficiente y simultáneamente del material analizado.⁽⁴⁶⁾ (Ver Figura N°5)

Se requieren dos condiciones para analizar muestras en un microscopio electrónico de barrido: que se encuentren libres de humedad y sean conductoras. En estos microscopios las muestras no conductoras ya sean orgánicas, biológicas, vidrios o polímeros, necesitan una cubierta metálica para lograr su observación, generalmente una cubierta de oro, o con carbono cuando se quiere realizar análisis. Por otro lado, las muestras conductoras pueden ser revisadas sin ningún tipo de cubierta.⁽⁴⁶⁾

En el caso de las muestras biológicas se procesan deshidratando con alcohol o acetona, posteriormente son secadas por el método de punto crítico y finalmente ser metalizadas. El método de punto crítico es una técnica de secado que permite conservar la forma y estructura celular de la muestra. Se basa en el reemplazo de los líquidos por CO₂, que es evaporado bajo ciertas condiciones de temperatura y presión sin dañar los tejidos de la muestra.⁽⁴⁶⁾



Figura N° 5. Microscopio Electrónico de Barrido.

CAPITULO IV
DISEÑO METODOLOGICO

4.0 DISEÑO METODOLOGICO

4.1 TIPO DE ESTUDIO

El tipo de estudio fue experimental y transversal.

-Experimental: Se preparó el extracto hidroalcohólico de propóleos, y se realizó un ensayo para determinar el tipo de interacción antimicrobiana entre un extracto de propóleos y ciprofloxacina contra las cepas ATCC 8739, 9027 y 14028 de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella enterica serovar Typhimurium*, respectivamente y se evaluó el tipo de efecto antibiótico y la cinética de muerte que esta combinación posee contra los microorganismos antes mencionados, así como el estudio de como afectaba a nivel morfológico la mezcla de antimicrobianos mediante microscopía electrónica de barrido.

-Transversal: Esta investigación se realizó en un período de tiempo que comprendió de octubre de 2019 a marzo de 2020.

4.2 INVESTIGACION BIBLIOGRAFICA

Para la recopilación de la información bibliográfica se consultaron libros, revistas científicas y artículos científicos en las siguientes bibliotecas:

- Dr. Benjamín Orozco de la Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador
- Central de la Universidad de El Salvador
- Universidad Dr. José Matías Delgado
- Internet

4.3 INVESTIGACION DE CAMPO

La muestra de propóleos fue recolectada en el municipio de Chilanga perteneciente al Departamento de Morazán, en mayo de 2019, este lugar se encuentra ubicado entre una cadena montañosa, su clima es cálido, se encuentra

a una elevación de 300 metros de altura sobre el nivel del mar, la flora circundante de la zona proporciona al propóleo la característica de poseer color verde. Se decidió estudiar estos propóleos debido a la existencia de un estudio previo sobre la elucidación de los compuestos mayoritarios presentes; realizado en la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador; encontrando un compuesto denominado Kukulcanin A, un flavonoide perteneciente a la familia de las chalconas. (Ver Anexo N° 1)

Universo: Todos los propóleos pertenecientes a los diferentes departamentos de El Salvador.

Muestra: Propóleos provenientes del Departamento de Morazán, específicamente del municipio de Chilanga.

Método de recolección: El método utilizado fue de malla plástica que consiste en una lámina de plástico con ranuras que las abejas rellenan con propóleos, lo que facilita su extracción.⁽⁶⁾

4.4 PARTE EXPERIMENTAL (Material y Equipo Ver Anexo N°2)

4.4.1 Preparación del extracto hidroalcohólico de propóleos al 2% m/v. (Ver Anexo N°3)

Se recolectó el propóleo perteneciente a la zona de Chilanga en el municipio de Morazán, el cual presentó color marrón oscuro, aroma característico y una textura blanda pastosa.

Metodología según Park *et al.* ⁽³⁸⁾ y Rejane *et al.* ⁽⁴⁷⁾

- Pesar 20 g de muestra de propóleos.
- Medir 1000 mL de etanol al 70%.
- Colocar en un beaker con capacidad de 2000 mL.
- Sonicar la mezcla durante 90 minutos.

- Macerar por 24 horas, evitando el contacto con la luz.
- Filtrar la muestra con ayuda de papel filtro de poro grueso y transferir a otro beaker de 2000 mL.
- Colocar el filtrado obtenido del paso anterior en el rotaevaporador, hasta eliminar la mayor parte de solvente utilizado.
- Colocar el filtrado obtenido del paso anterior en genevac hasta llevar a sequedad mínima el extracto.
- Proceder a liofilizar la muestra.
- Almacenar la muestra en un tubo limpio y seco, protegido de la luz.

4.4.2 Cultivo de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* (Ver Anexo N°4)

Para la preparación de los cultivos se utilizaron bacterias pertenecientes al cepario del Laboratorio de Control de Calidad Microbiológico de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador; se seleccionaron estos microorganismos debido a la resistencia que han adquirido y a la problemática que surge al tratar de erradicarlos cuando se vuelven patógenos para el ser humano.

- Reanimar las cepas ATCC 8739, 9027 y 14028 de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*, contenidas en crioviales a -80°C.
- Colocar las cepas en estudio en un pre enriquecimiento con caldo nutritivo e incubar durante 24 horas.
- Sembrar las cepas en Agar Nutritivo.
- Incubar durante 24 horas a 37°C.

4.4.3 Estandarización de inóculo de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* y verificación de su concentración mediante recuento en placa. (Ver Anexo N°5)

- Sembrar cada uno de los microorganismos en 3 tubos de agar inclinado

conteniendo 10 mL de agar nutritivo.

-Incubar a 37°C durante 24 horas.

-Agregar 1 mL de solución salina estéril a cada uno de los tubos.

-Adicionar 2 o 3 perlas de ebullición estéril para arrastrar el cultivo obtenido en la superficie del agar.

-Transferir la suspensión de cada microorganismo de los tubos de agar inclinado a tubos estériles.

-Leer en espectrofotómetro UV-Vis a 580nm, hasta ajustar a una absorbancia entre 25-35%T.

-Tomar de la suspensión estandarizada a 25-35%T, 0.1 mL a un tubo conteniendo 9.9 mL de solución salina, la cual será la dilución 10^{-2} , repetir este procedimiento hasta obtener la dilución 10^{-6} .

-Transferir de la dilución 10^{-6} 1.0 mL a un tubo conteniendo 9.0 mL de solución salina estéril para obtener la dilución 10^{-7} .

-Plaquear en agar nutritivo por el método de extendido y por duplicado 0.1 mL y 1.0mL de la dilución 10^{-7} .

-Incubar a 37°C durante 24 horas.

-Realizar el recuento para obtener la cantidad de microorganismo presente en la suspensión estandarizada.

4.4.4 Evaluación de la actividad antibacteriana de ciprofloxacina y el extracto hidroalcohólico de propóleos contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* mediante la técnica de difusión en agar. (Ver Anexo N°6)

-Colocar 20 mL de agar Mueller-Hinton en 6 placas de petri, dejar solidificar durante 1 hora.

-Perforar el medio de cada placa realizando 4 agujeros.

-Inocular las placas previamente perforadas con *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella enterica serovar Typhimurium* (2 placas por cada microorganismo) por el método de hisopado.

-Colocar en un pocillo 150 μL del antibiótico ciprofloxacina a una concentración de 0.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y en los 3 pocillos restantes las concentraciones de extracto hidroalcohólico de propóleos siguientes 750 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 3000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, en cada una de las placas inoculadas con los 3 microorganismos.

-Incubar durante 24 horas a 37°C.

-Realizar lectura y medición de halos de inhibición.

4.4.5 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria por

Microdilución de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella enterica serovar Typhimurium* (Ver Anexo N°7)

-Disolver en 10.0 mL de metanol una cantidad adecuada de Extracto liofilizado de Propóleos para obtener una solución de 14,100 μg .

-Diluir en Dimetilsulfóxido (DMSO) al 10%, a partir de la solución anteriormente preparada hasta obtener las siguientes concentraciones: 550.150 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 825.230 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1237.85 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1856.780 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 2785.180 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 4177.770 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 6266.660 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 9400.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de extracto hidroalcohólico de propóleos.

-Partiendo de una solución madre a una concentración de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$; diluir en agua estéril el antibiótico ciprofloxacina hasta obtener las siguientes concentraciones: 0.030 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0.060 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0.125 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0.250 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0.500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 2.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 4.000 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

-Partiendo de una solución madre a una concentración de 1060 $\mu\text{g}/\text{mL}$, diluir en agua estéril el antibiótico amoxicilina hasta obtener las siguientes concentraciones: 0.030 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0.060 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0.124 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0.249 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0.490 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0.990 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1.990 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 3.990 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

-Disposición de las soluciones en la placa de 96 pocillos, en las filas 1, 7 y 4 se colocarán las 8 concentraciones correspondientes de ciprofloxacina, en las filas

2, 5 y 8 las concentraciones correspondientes a amoxicilina, en las filas 3, 6 y 9 las concentraciones correspondientes al extracto de propóleos, en la fila 10 el control positivo de crecimiento, es decir caldo BHI al 1% y las cepas ATCC 8739, 9027 y 14028 de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* y en las filas 11 y 12 el control negativo, es decir solo con caldo BHI al 1%.

-Llenar la placa de 96 pocillos por filas de la siguiente manera colocando 100 μ L de caldo BHI, 100 μ L de extracto de propóleos a la concentración respectiva, ciprofloxacina o amoxicilina y 10 μ L de cada una de las cepas en estudio a la concentración de 1×10^8 UFC/mL.

-Incubar la placa durante 24 horas a 37°C.

-Agregar 10 μ L de Resazurina al 0.01% m/v e incubar durante 2 horas.

-Realizar lectura.

Notas: El metanol utilizado para el liofilizado es considerado como un disolvente, no diluyente.

El diluyente para la solución madre de los antibióticos es agua estéril.

El disolvente utilizado para la preparación de la Resazurina al 0.01% m/v fue agua estéril.

Este ensayo se realizó por triplicado, se tomó como control positivo de crecimiento uno de los microorganismos en estudio (1 microorganismo por placa), y colocando en las 3 placas el siguiente orden de las cepas *Pseudomonas aeruginosa* en las filas 1, 2 y 3, *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* en las filas 4, 5 y 6 y *Escherichia coli* en las filas 7, 8 y 9.

Tomar en cuenta la dilución realizada en el volumen total de cada pocillo para obtener la concentración real de CMI.

4.4.6 Determinación del Efecto Antibiótico Mediante el Método de Tablero de Ajedrez por Microdilución (Ver Anexo N°8)

-Realizar las respectivas diluciones 3 veces por encima y por debajo de la CMI del antibiótico ciprofloxacina y el extracto de propóleos.

-Llenar cada pocillo de la microplaca de la siguiente manera: llenar la primera fila con la serie de diluciones correspondientes al extracto hidroalcohólico de propóleos, llenar la primera columna con las diluciones correspondientes al antibiótico ciprofloxacina, dejar en el pocillo que une a la fila y la columna, solo con caldo BHI al 1% y el microorganismo en estudio, la cual corresponde a la concentración de 0 µg/mL.

-Colocar en cada pocillo: 100 µL de caldo BHI al 1 %, 100 µL de extracto de propóleos a la concentración respectiva o de ciprofloxacina y 10 µL de las cepas ATCC 8739, 9027 y 14028 de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* a la concentración de 1×10^8 UFC/mL.

-Llenar los demás pocillos de la misma manera, a diferencia de que contendrán 50 µL de ciprofloxacina y 50 µL de extracto de propóleos correspondientes a la concentración de cada fila y columna respectiva.

-Incubar durante 24 horas, a 37°C.

-Después de incubar, agregar en cada pocillo 25 µL del indicador resazurina al 0.01% m/v.

-Incubar la placa de microdilución durante 2 horas a 37°C.

-Visualizar el cambio de color en los pocillos.

-Construir el isoblograma y calcular la concentración fraccional inhibitoria para cada uno de los ensayos.

Nota: Se ejecutó este ensayo por triplicado para cada microorganismo y se consideró la dilución realizada al mezclar el antibiótico con el extracto de propóleos preparando concentraciones 2 veces arriba de las deseadas en el estudio, para considerar la dilución realizada de las mezclas al adicionar el medio de cultivo.

4.4.7 Cinética de Muerte (Ver anexo N°9)

-Realizar cinética de muerte por el método de microgota al tipo de interacción que se obtenga en la técnica de tablero de ajedrez.

-Preparar las concentraciones para las cepas de *Escherichia coli* y *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* de Ciprofloxacina 0.060 µg/mL y Extracto de Propóleos 165.785 µg/mL, y para *Pseudomonas aeruginosa* las concentraciones de 0.119 µg/mL y 110.523 µg/mL respectivamente.

-Agregar a los tubos de microcentrífuga las cantidades que se indican en la siguiente tabla:

Tabla N°1. Contenido de los tubos de microcentrífuga para la prueba de cinética de muerte.

N° Muestra	Contenido por tubo (1500 µL)		
	Cepa	Medio de cultivo	Antimicrobiano
1		Caldo BHI al 1% (1000 µL)	-
2	8739 <i>Escherichia coli</i>	Caldo BHI al 1% (500 µL)	Ciprofloxacina (500 µL)
3	10 ⁸ UFC/mL	Caldo BHI al 1% (500 µL)	Extracto Hidroalcohólico de Propóleos (500 µL)
4	(500 µL)	Caldo BHI al 1% (500 µL)	Mezcla Ciprofloxacina + Extracto Hidroalcohólico de Propóleos (500 µL)

-Realizar 4 muestras por bacteria de las cepas ATCC 9027 y 14028 de *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*, a las concentraciones correspondientes ciprofloxacina y extracto hidroalcohólico de

propóleos, como se muestra anteriormente, obteniendo un total de 12 muestras, con un volumen total de 1500 μL cada una.

-Tomar 100 μL de cada mezcla y diluir a 1000 μL con solución salina, obteniendo así la dilución 10^{-1} la cual corresponderá al tiempo cero del estudio.

-Inocular 5 μL de la dilución 10^{-1} por triplicado en la primera porción de una placa conteniendo agar Mueller Hinton, previamente seccionada en 7 partes iguales.

-Incubar durante 2 horas a 37°C la placa inoculada y cada tubo conteniendo la dilución realizada.

-Tomar 100 μL del tubo que contiene la dilución 10^{-1} , colocarlos en otro tubo y diluir a 1,000 μL , para obtener la dilución 10^{-2} .

-Repetir el procedimiento anterior desde la realización de las diluciones, (Ejemplo: Tomar 100 μL del tubo que contiene la dilución 10^{-2} , colocarlos en otro tubo y diluir a 1,000 μL , para obtener la dilución 10^{-3}); inocular en la placa e incubar, hasta obtener la dilución 10^{-9} , las cuales deberán realizarse lo más rápido posible en cada uno de los tiempos del estudio 4, 6, 8, 10, 12, 24, 26 y 30 horas respectivamente.

-Realizar el recuento de las colonias obtenidas en cada porción de la placa al finalizar el proceso de incubación de 48 horas.

4.4.8 Microscopía Electrónica de Barrido (Ver Anexo N°10)

Metodología según Coelho, D. *et al*⁽¹⁸⁾, Ashour, A. *et al*⁽³⁾ y Opitakorn, A. *et al*⁽³⁶⁾

-Realizar microscopía electrónica de barrido a las mismas mezclas a las que se realizó cinética de muerte.

-Incubar las mezclas durante 24 horas a 37°C .

-Centrifugar las 12 muestras por 15 minutos a 16000 rpm.

-Separar el sobrenadante del pellet obtenido.

-Agregar al pellet obtenido 1000 μL de Glutaraldehído al 2.5%.

-Almacenar las mezclas durante 24 horas a 4°C .

- Descartar el sobrenadante del pellet y realizar un lavado con 1000 μ L de buffer fosfato pH 7.4.
- Almacenar las mezclas durante 10 minutos a 4°C.
- Realizar nuevamente un lavado con 1000 μ L de buffer fosfato.
- Descartar el sobrenadante y agregar 250 μ L de Osmio almacenar durante 1 hora a 4 °C.
- Descartar el sobrenadante del pellet.
- Realizar dos lavados con buffer fosfato y almacenar a 4 °C por 10 minutos.
- Descartar el sobrenadante del pellet y agregar 1000 μ L de etanol al 30% y almacenar a 4 °C por 10 minutos.
- Repetir el procedimiento con etanol al 50%, 70%, 80%, 90% y 100%, almacenando durante 10 minutos a 4°C y descartando el sobrenadante del pellet.
- Realizar lavados con acetona en proporción 3:1, 2:2 y 1:3 de alcohol acetona; almacenando durante 10 minutos a 4°C y descartando el sobrenadante del pellet.
- Realizar un lavado con acetona pura, almacenar a 4 °C por 10 minutos.
- Descartar el sobrenadante del pellet.
- Secar cada una de las muestras.
- Colocar cada una de las muestras en un portaobjetos y fijarlas.
- Realizar un revestimiento de oro.
- Visualizar las muestras en el microscopio electrónico de barrido.

Nota: Si el pellet bacteriano se mezcla con una de las soluciones, centrifugar a 16000 rpm durante 5 minutos. Manipular cuidadosamente la solución de Osmio ya que es altamente tóxico y cancerígeno realizar el procedimiento en cámara de extracción de gases, con gafas de protección y mascarilla contra gases.

4.5 MODELO MATEMATICO

4.5.1 Interpretación de los resultados obtenidos en la determinación del efecto antibiótico mediante el método del tablero de ajedrez.

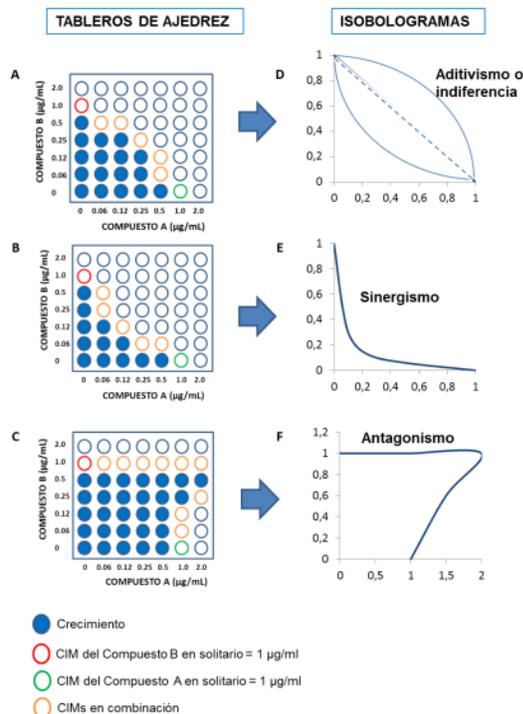
Para la realización del isoblograma se utilizó el programa Graphpad, un software estadístico que permite interpretar resultados obtenidos a partir de ensayos biológicos.

CONSTRUCCION DEL ISOBOLOGRAMA

Cada isoblograma se construyó de la siguiente manera, la concentración más baja del antimicrobiano que inhibió el crecimiento a lo largo de cada fila, en este caso correspondiente al antibiótico ciprofloxacina.

Se graficó como coordenada en el eje x y la concentración más baja del antimicrobiano diluido a lo largo de cada columna y que inhibió el crecimiento, correspondiente al extracto hidroalcohólico de propóleos en la placa de 96 pocillos fue tomada como la coordenada del eje y.

Se conectaron las series de coordenadas generadas para cada combinación de antimicrobianos, formando el paso límite entre la inhibición y el crecimiento en el tablero de ajedrez y de acuerdo al patrón obtenido se determinó el resultado de este experimento como sumación, sinergismo, antagonismo o indiferencia. (Ver Figura N°6).



Fuente: Butassi, E. (2018). Combinaciones de extractos de plantas entre sí y con anti fúngicos comerciales como medio de potenciar la actividad contra hongos patógenos para el humano.

Figura N° 6. Representación de resultados obtenidos en la determinación de la interacción antimicrobiana en el tablero de ajedrez A, B y C con sus respectivos isobogramas D, E y F.

Como una reafirmación del resultado obtenido a partir del isobograma se calculó la concentración fraccional inhibitoria (CFI) de cada antimicrobiano, la cual se deriva de la división de la concentración del antimicrobiano necesaria para inhibir el crecimiento en una fila o columna dada de la combinación por la CMI de los microorganismos de prueba para ese antimicrobiano.

La CFI fue calculada por la suma de las CFI por separado para cada uno de los antimicrobianos presentes en el tubo o pocillo, en este caso para ciprofloxacina y el extracto hidroalcohólico de propóleos, haciendo uso de las ecuaciones siguientes.

$$CFI_A = \frac{CMI_A \text{ en presencia de B}}{CMI_A} \quad CFI_B = \frac{CMI_B \text{ en presencia de A}}{CMI_B}$$

$$CFI = \sum CFI_A + CFI_B$$

Donde:

CMI_A: Concentración mínima inhibitoria del antibiótico ciprofloxacina en presencia del extracto hidroalcohólico de propóleos al 2%.

CMI_B: Concentración mínima inhibitoria del extracto hidroalcohólico de propóleos al 2% en presencia del antibiótico ciprofloxacina.

CMI_A: Concentración mínima inhibitoria del antibiótico ciprofloxacina.

CMI_B: Concentración mínima inhibitoria del extracto hidroalcohólico de propóleos al 2%.

CFI_A: Concentración fraccional inhibitoria de ciprofloxacina.

CFI_B: Concentración fraccional inhibitoria del extracto hidroalcohólico de propóleos al 2%.

Con este método, el resultado de concentración fraccional inhibitoria según Jenkins *et al* ⁽³¹⁾ y Shields *et al* ⁽⁵⁰⁾ se interpretó como se muestra en el Cuadro N°1.

Cuadro N° 1. Tipo de Interacción según el valor de CFI obtenido.

Tipo de Interacción	Valor de CFI
Sinergismo	$\sum CFI \leq 0.5$
Adición o Sumación	$> 0.5 \sum CFI \leq 1$
Indiferencia	$> 1 \sum CFI \leq 4$
Antagonismo	$\sum CFI > 4$

CAPITULO V
RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

5.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.1 Preparación de Extracto Hidroalcohólico de Propóleos al 2%.

Se obtuvo un extracto seco de propóleos de color café claro (Ver Figura N°7), con un peso de 9.80 g; y un porcentaje de rendimiento del 49%.



Figura N° 7. Extracto Hidroalcohólico de Propóleos Obtenido.

Carrillo; M, *et al* ⁽¹⁰⁾ obtuvo 4 extractos hidroalcohólicos de propóleos secos color café claro, pudiéndose atribuir dicho color a la presencia de flavonoides en las muestras, con valores de porcentajes de rendimiento que van de 33% a 55%; el extracto que se obtuvo en la investigación realizada, fue similar en cuanto a forma física del extracto seco y porcentaje de rendimiento, sugiriendo la presencia de flavonoides y desempeño promedio de preparación.

5.2 Evaluación de la actividad antibacteriana de ciprofloxacina y el extracto hidroalcohólico de propóleos contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella enterica serovar Typhimurium* mediante la técnica de difusión en agar.

Para determinar la concentración de Ciprofloxacina utilizada se investigaron los rangos o puntos de corte frente a las cepas estudiadas de: *Escherichia coli* <1 µg/mL ⁽²⁸⁾, *Pseudomonas aeruginosa* <1 µg/mL ⁽⁴⁾ y *Salmonella enterica* 0.125-1 µg/mL ⁽³¹⁾ y luego se tomó aproximadamente el punto intermedio de estas concentraciones.

Se evaluó la actividad antimicrobiana del extracto hidroalcohólico de propóleos y ciprofloxacina realizando la lectura de esta prueba mediante la medición de los halos de inhibición. (Ver figura N°8).

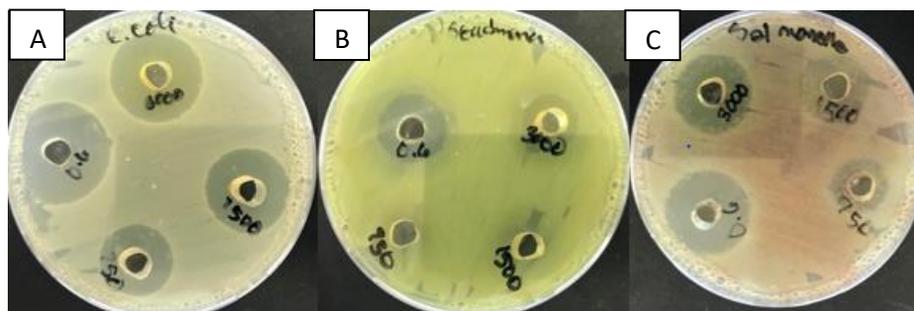


Figura N° 8. Resultados del estudio de difusión en agar para
 A: *Escherichia coli*, B: *Pseudomonas aeruginosa*,
 C: *Salmonella enterica serovar Typhimurium*.

En la figura N°9, se observan las concentraciones ensayadas para Ciprofloxacina y Extracto Hidroalcohólico de Propóleos contra las 3 cepas en estudio, en el caso de ciprofloxacina se utilizó una concentración de 0.6 $\mu\text{g/mL}$ y se obtuvieron como zonas de inhibición 30mm, 25mm y 26mm; con el extracto hidroalcohólico de propóleos se utilizaron 3 concentraciones y los resultados de las zonas de inhibición fueron para 750 $\mu\text{g/mL}$: 20mm, 0mm y 15mm; 1500 $\mu\text{g/mL}$: 25mm, 5mm y 18mm; y 3000 $\mu\text{g/mL}$: 28mm, 23mm, 25mm para *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella entérica serovar typhimurium* respectivamente.

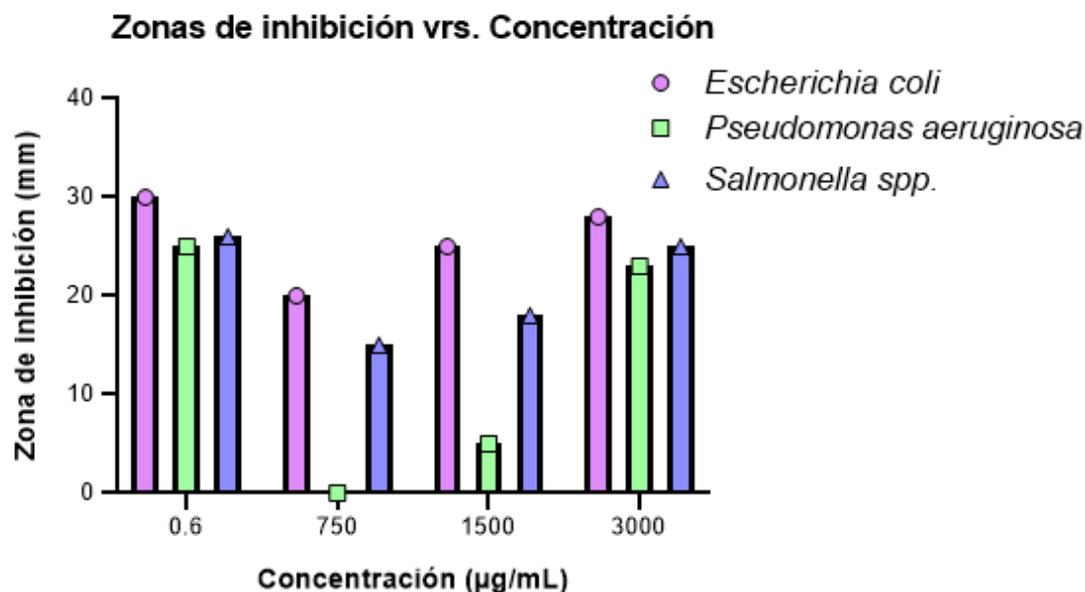


Figura N° 9. Concentraciones de extracto hidroalcohólico de propóleos y ciprofloxacina en la prueba de difusión en agar con sus respectivos halos de inhibición.

Escherichia coli presentó mejores resultados de inhibición frente a extracto hidroalcohólico de propóleos a una concentración de 1,500 µg/mL; en el caso de *Pseudomonas aeruginosa* no se presentó inhibición a la concentración de 750 µg/mL y en cuanto a la concentración de 1,500 µg/mL no presentó inhibición significativa.

Shahbaz *et al* ⁽⁴⁸⁾, obtuvo como resultado del estudio de la actividad antimicrobiana de extracto hidroalcohólico de propóleos a una concentración de 12,000 µg/mL, mediante difusión en agar para la cepa de *Escherichia coli*, una zona de inhibición de 26.37 ± 1.3 mm, en el caso del presente trabajo de investigación se obtuvieron las zonas de inhibición a las concentraciones de 750 µg/mL: 20mm, 1500 µg/mL: 25 mm y 3000 µg/mL: 28 mm, comparando los resultados con Shahbaz *et al*, se evidenció que coinciden con los valores obtenidos en dicha investigación, por lo que se puede decir que a medida aumenta la concentración también aumenta la zona de inhibición obtenida, es

decir que existe una proporcionalidad directa; sin embargo esta se mantiene entre 20 y 28 mm, en otras palabras sin importar que aumente la concentración del extracto hidroalcohólico de propóleos esto no influirá en el aumento de la zona de inhibición.

En la presente investigación se obtuvieron como resultados en las 3 concentraciones ensayadas 750 µg/mL: 0mm, 1500 µg/mL: 5mm y 3000 µg/mL: 23 mm; Mohammadi *et al* ⁽³⁴⁾, realizó el estudio de la actividad antimicrobiana de extracto hidroalcohólico de propóleos a las concentraciones de 375, 750 y 1500 µg/mL, mediante difusión en agar para la cepa de *Pseudomonas aeruginosa*, obteniendo como resultados zonas de inhibición de 0 mm, 0 mm y 7 mm respectivamente; con lo cual se compara que los resultados son similares en ambos estudios y a partir de la concentración de 1500 µg/mL se evidenció la actividad antimicrobiana del extracto hidroalcohólico de propóleos contra *Pseudomonas aeruginosa* y que al aumentar dicha concentración, aumenta la zona de inhibición.

Bonvehí, *et al* ⁽⁷⁾, realizó el estudio de la actividad antimicrobiana de extracto hidroalcohólico de propóleos a las concentraciones de 0.025-2 % v/v, mediante difusión en agar para la cepa de *Salmonella enterica serovar Typhimurium*, obteniendo como resultados un rango de zonas de inhibición de 11-18 mm; en la investigación realizada se obtuvieron como resultados a las concentraciones de 750 µg/mL: 15 mm, 1500 µg/mL: 18 mm y 3000 µg/mL: 25 mm; todas las concentraciones ensayadas se realizaron partiendo del extracto hidroalcohólico de propóleos al 2% m/v; de acuerdo a los resultados obtenidos en ambos estudios se visualiza que se mantienen los resultados en el rango antes mencionado.

5.3 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria por Microdilución de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*.

Se visualizó el resultado de la concentración mínima inhibitoria en el ensayo como el pocillo en el cual el color violeta oscuro representa la inhibición del crecimiento microbiano tomando en cuenta que la concentración de cada antimicrobiano en estudio va aumentando de derecha a izquierda, por lo cual los pocillos señalados con flechas indican la concentración mínima de extracto hidroalcohólico de propóleos y ciprofloxacina que inhibieron el crecimiento microbiano (Ver Figura N°10).

Se obtuvo como resultado la CMI correspondiente para cada cepa en estudio (ver cuadro N° 2), en el caso de *Escherichia coli* y *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* se obtuvieron los valores de CMI para Extracto Hidroalcohólico de propóleos de 1326.276 µg/mL y para *Pseudomonas aeruginosa* se obtuvo un valor de 884.180 µg/mL; *Escherichia coli* dio como resultado de CMI para ciprofloxacina 0.238 µg/mL, *Pseudomonas aeruginosa* 0.476 µg/mL y *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* 0.119 µg/mL.

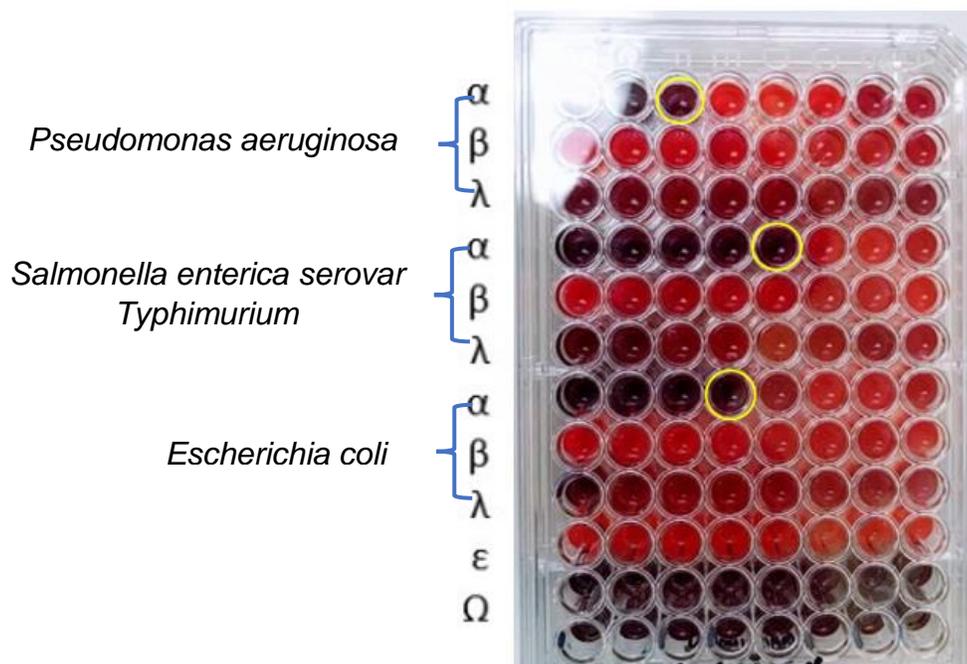


Figura N° 10. Resultados del ensayo de CMI por Microdilución: α Ciprofloxacina
 β Amoxicilina λ Extracto Hidroalcohólico de Propóleos
 ε Control positivo de crecimiento Ω Control negativo.

Cuadro N° 2. Resultados del ensayo de CMI por microdilución.

Cepa	CMI para Extracto Hidroalcohólico de Propóleos ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	CMI para Ciprofloxacina ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
<i>Escherichia coli</i>	1326.276	0.238
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	884.180	0.476
<i>Salmonella enterica serovar Typhimurium</i>	1326.276	0.119

Existe una clasificación de resultados para CMI a partir de extractos, según Wang, YC⁽⁵⁴⁾ el cual interpreta de acuerdo a un rango de concentración mínima inhibitoria como: actividad fuerte CMI $<10 \mu\text{g}/\text{mL}$, actividad fuerte a moderada

CMI entre 10-100 $\mu\text{g/mL}$, actividad débil a moderada CMI entre 100-1000 $\mu\text{g/mL}$ y actividad débil CMI $>1000 \mu\text{g/mL}$; el resultado obtenido en esta investigación categoriza al extracto hidroalcohólico de propóleos frente a *Pseudomonas aeruginosa* como de actividad débil a moderada ya que la CMI presentada estuvo en el rango de 100-1000 $\mu\text{g/mL}$ y frente a *Escherichia coli* y *Salmonella enterica serovar Typhimurium* se clasifica como actividad débil, ya que la CMI obtenida para las 2 cepas fue mayor a 1000 $\mu\text{g/mL}$.

5.4 Determinación del Efecto Antibiótico Mediante el Método de Tablero de Ajedrez de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella enterica serovar Typhimurium*.

El pocillo indicado con una flecha (Ver Figuras N° 11, 12 y 13); corresponde a la concentración mínima de la mezcla de extracto hidroalcohólico de propóleos y ciprofloxacina fue capaz de inhibir el crecimiento microbiano para *Escherichia coli* las concentraciones fueron de 165.785 $\mu\text{g/mL}$ y 0.060 $\mu\text{g/mL}$; para *Pseudomonas aeruginosa* de 110.523 $\mu\text{g/mL}$ y 0.119 $\mu\text{g/mL}$ y para *Salmonella enterica serovar Typhimurium* de 165.785 $\mu\text{g/mL}$ y 0.060 $\mu\text{g/mL}$ de extracto hidroalcohólico de propóleos y ciprofloxacina respectivamente.

De acuerdo al patrón de inhibición mostrado en el ensayo, representado en el isoblograma y al resultado del coeficiente fraccional inhibitorio para la cepa ATCC 8739 de *Escherichia coli* que fue de 0.377 y para la cepa ATCC 9027 de *Pseudomonas aeruginosa* que fue de 0.375 presentando ambas cepas una interacción sinérgica. Mientras que la cepa ATCC 14028 de *Salmonella enterica serovar Typhimurium* cuyo coeficiente fraccional inhibitorio fue de 0.629, resultando una interacción correspondiente a sumación. (Ver Figura N°14) (Ver Anexo N°12).

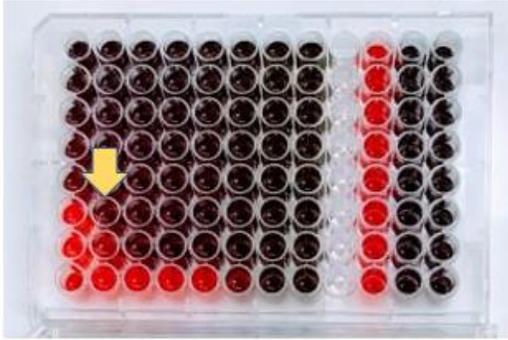


Figura N° 11. Resultado de la determinación del efecto antibiótico mediante el método de tablero de ajedrez de *Escherichia coli*.

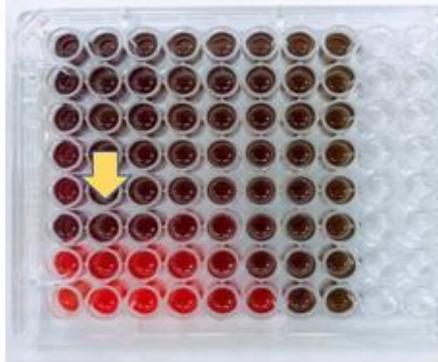


Figura N° 12. Resultado de la determinación del efecto antibiótico mediante el método de tablero de ajedrez de *Pseudomonas aeruginosa*.

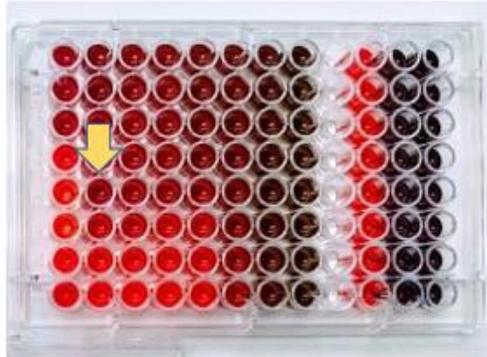


Figura N° 13. Resultado de la determinación del efecto antibiótico mediante el método de tablero de ajedrez de *Salmonella enterica serovar Typhimurium*.

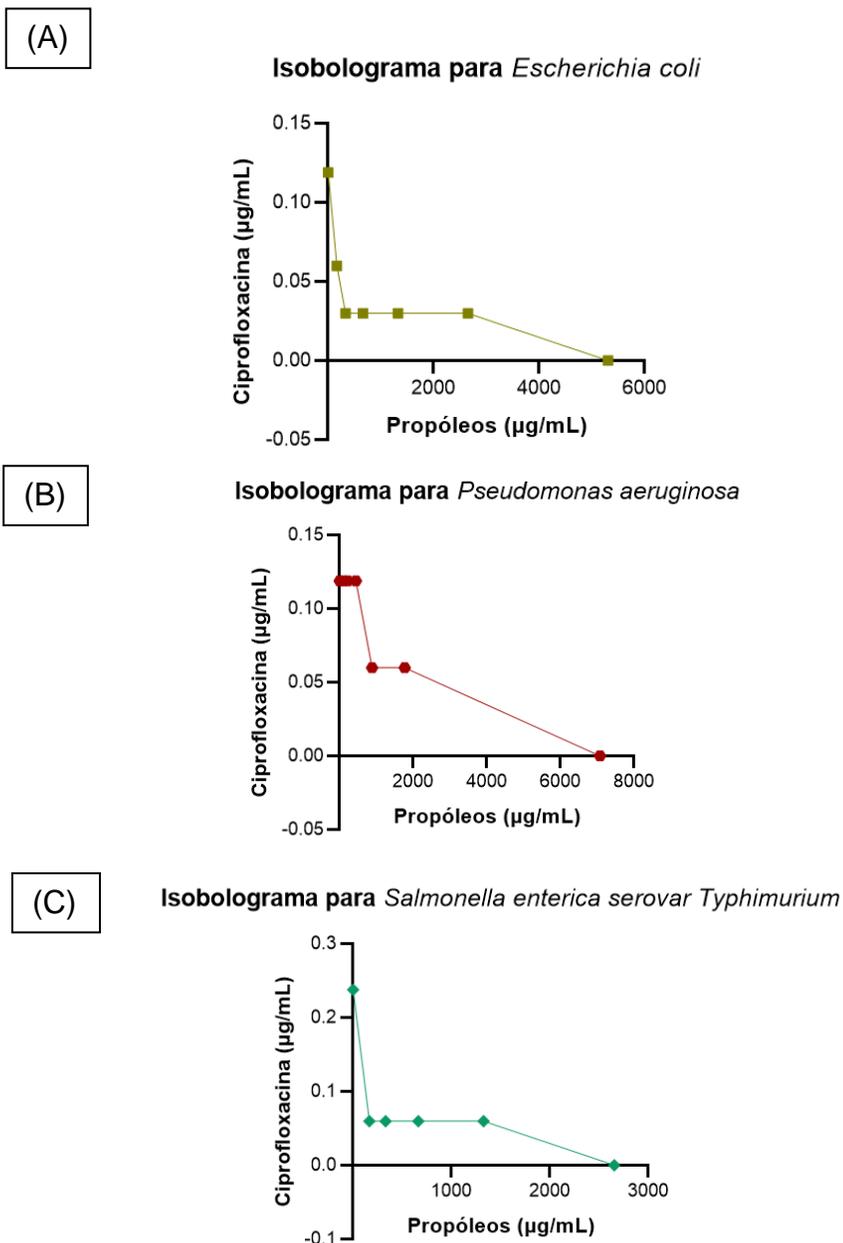


Figura N° 14. Isoblogramas correspondientes a (A) *Escherichia coli*, (B) *Pseudomonas aeruginosa* y (C) *Salmonella enterica serovar Typhimurium*.

En el presente estudio 2 de las 3 cepas ensayadas, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* presentaron una interacción sinérgica entre el extracto hidroalcohólico de propóleos y ciprofloxacina un antibiótico de la familia de las

fluoroquinolonas; es decir que al mezclar estos 2 compuestos presentan un aumento en su actividad que al actuar individualmente; Sin embargo, para *Salmonella enterica serovar Typhimurium* el resultado obtenido fue un tipo de interacción de sumación; por ende los antimicrobianos al ser utilizados en combinación presentan la sumatoria de sus actividades antimicrobianas evaluadas por separado.

Mientras que Issam *et al* ⁽¹⁾ encontraron que los extractos hidroalcohólicos de propóleos estudiados mejoraron sinérgicamente la efectividad de los antibióticos utilizados, entre ellos levofloxacin, en comparación con la investigación realizada los resultados obtenidos son semejantes por lo cual se puede afirmar que esta familia de antibióticos mejora su actividad antimicrobiana al ser combinados con un extracto hidroalcohólico de propóleos.

5.5 Cinética de Muerte

Para este ensayo se utilizó el criterio de Pearson *et al* ⁽⁴⁰⁾ para determinar muerte bacteriana por reducción de 3 logaritmos.

En la figura N°15 se muestra el comportamiento de la cepa de *Escherichia coli* sin la presencia de antimicrobianos a las 30 horas hubo 2.72 de reducción logarítmica con respecto al recuento inicial; con ciprofloxacina a la concentración de 6×10^{-10} µg/mL, a las 26 horas hubo una reducción logarítmica de 3.03, por lo cual se dictamina muerte bacteriana, en presencia del extracto hidroalcohólico de propóleos, a las 30 horas hubo una reducción de 2.78, se evidencia que no presenta muerte microbiana; y el comportamiento en combinación con ciprofloxacina y extracto hidroalcohólico de propóleos a las concentraciones de 6×10^{-8} µg/mL y 1.66×10^{-4} µg/mL, en el tiempo de 12 horas hubo una reducción logarítmica de 3.08, la cual presentó muerte bacteriana.

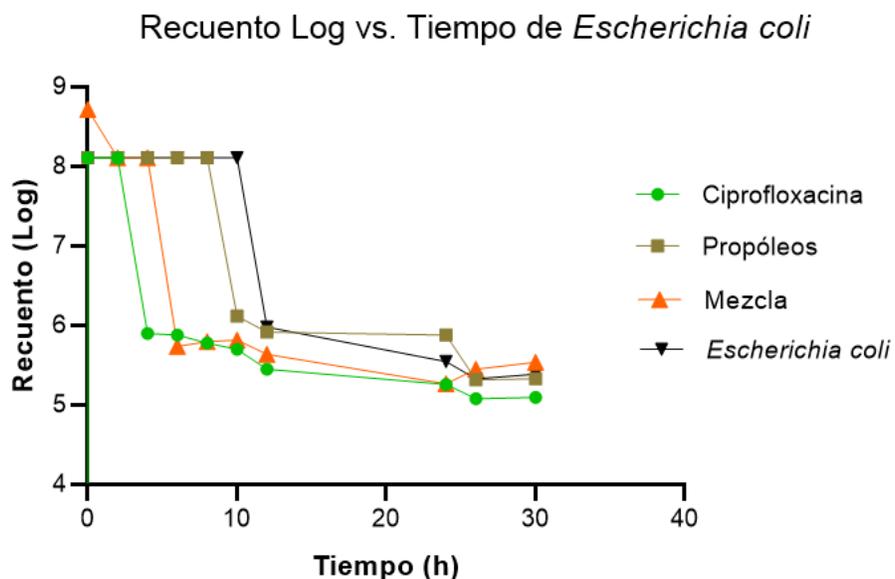


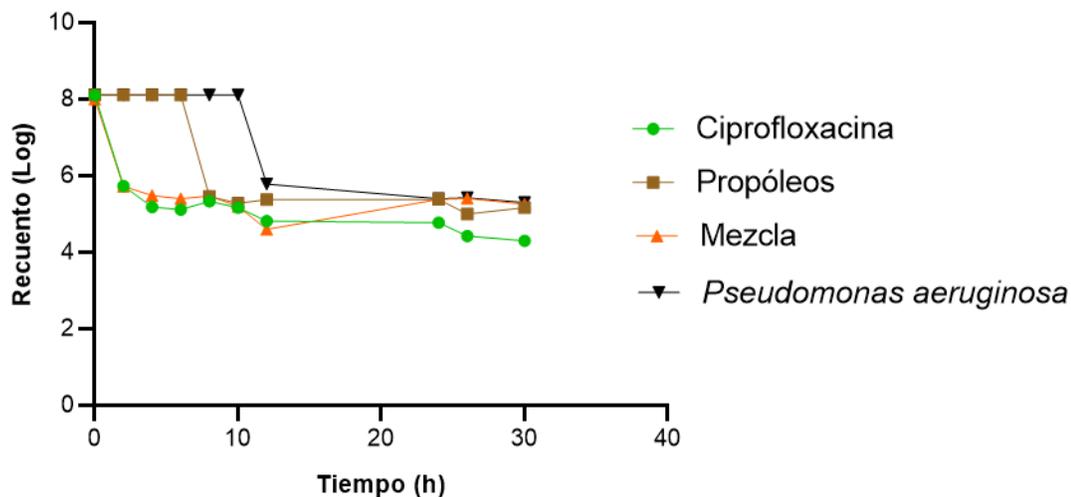
Figura N° 15. Representación gráfica de resultados obtenidos en ensayo de cinética de muerte para *Escherichia coli*.

El comportamiento de *Escherichia coli* en la cinética de muerte del presente estudio utilizando ciprofloxacina presentó una reducción de 3.03 log en 26 horas utilizando una concentración de 0.060 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Chalkley y Koornhof⁽¹³⁾, obtuvieron una reducción de 3 log en 4 horas a una concentración de 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$; es importante mencionar que esta investigación fue realizada en 1985, por lo que se puede evidenciar que el comportamiento de esta cepa bacteriana ha ido en aumento en cuando a su resistencia a este antimicrobiano por lo que en el presente estudio se obtiene reducción logarítmica de 3 log en mayor tiempo al del estudio antes mencionado.

La figura N°16 y el cuadro N°3 muestran el comportamiento de la cepa *Pseudomonas aeruginosa* la cual en presencia de ciprofloxacina, extracto hidroalcohólico de propóleos y la mezcla de ambos presentó muerte microbiana.

Cuadro N° 3. Resultados de cinética de muerte para *Pseudomonas aeruginosa*.

Cepa ATCC + Antimicrobiano	Tiempo (h)	Reducción logarítmica	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	30	2.81	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> + Ciprofloxacina	12	3.29	1.19×10^{-7}
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> + Extracto Hidroalcohólico de Propóleos	26	3.11	1.11×10^{-6}
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> + Mezcla (Ciprofloxacina y Extracto Hidroalcohólico de Propóleos)	12	3.40	1.19×10^{-7} 1.11×10^{-4}

Recuento Log vs. Tiempo de *Pseudomonas aeruginosa*Figura N° 16. Representación gráfica de resultados obtenidos en ensayo de cinética de muerte para *Pseudomonas aeruginosa*.

En Carneiro *et al* ⁽⁸⁾, se obtuvo una reducción de 3 log para *Pseudomonas aeruginosa* en 3 horas; el comportamiento de *Pseudomonas aeruginosa* en la cinética de muerte en este estudio utilizando ciprofloxacina presentó una

reducción de 3 log en 12 horas a una concentración de 0.119 µg/mL; es importante destacar que la relación que tiene la concentración utilizada en Carneiro *et al.* del antibiótico es 4 veces mayor a la utilizada en el presente estudio, por lo tanto entre mayor sea la concentración de ciprofloxacina menor es el tiempo necesario para alcanzar la reducción de 3 log y declarar muerte bacteriana.

La figura N°17 y el cuadro N°4 muestran el comportamiento de la cepa *Salmonella enterica serovar Typhimurium* la cual en presencia de ciprofloxacina y la mezcla de ciprofloxacina y extracto hidroalcohólico de propóleos presentó muerte microbiana. (Ver anexo N°13).

Cuadro N° 4. Resultados de cinética de muerte para *Salmonella enterica serovar Typhimurium*.

Cepa ATCC + Antimicrobiano	Tiempo (h)	Reducción logarítmica	Concentración (µg/mL)
<i>Salmonella enterica serovar Typhimurium</i>	30	2.66	-
<i>Salmonella enterica serovar Typhimurium</i> + Ciprofloxacina	24	3.01	6x10 ⁻¹¹
<i>Salmonella enterica serovar Typhimurium</i> + Extracto Hidroalcohólico de Propóleos	30	2.86	-
<i>Salmonella enterica serovar Typhimurium</i> + Mezcla (Ciprofloxacina y Extracto Hidroalcohólico de Propóleos)	18	3.03	6x10 ⁻¹⁰ 1.66x10 ⁻⁶

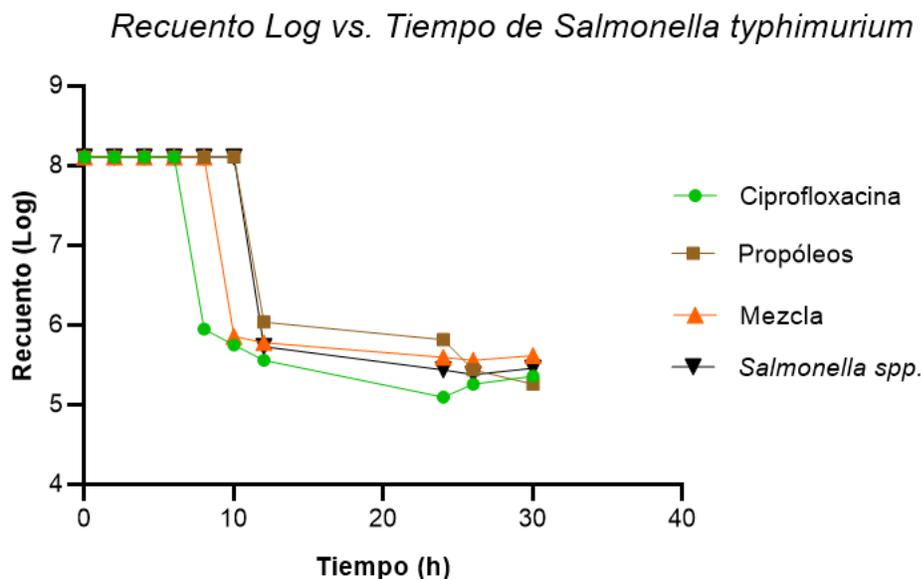


Figura N° 17. Representación gráfica de resultados obtenidos en ensayo de cinética de muerte para *Salmonella enterica serovar Typhimurium*.

En Singh *et al* ⁽⁵⁰⁾, se obtuvo una reducción de 3 log en 6 horas a una concentración de 6 µg/mL; *Salmonella enterica serovar Typhimurium* en la cinética de muerte del presente estudio utilizando ciprofloxacina presentó una reducción de 3.01 log en 24 horas utilizando una concentración de 0.060 µg/mL; por lo cual se puede comparar que la relación entre la concentración del antimicrobiano es directamente proporcional a la reducción logarítmica para la cepa estudiada.

5.6 Microscopía Electrónica de Barrido

En la Figura N°18 A, se observó la morfología característica de *Escherichia coli* en forma de bacilo y con normal crecimiento; en la Figura N°18 B, luego de ser expuesta a ciprofloxacina se observaron células agrupadas formando cúmulos; en la Figura N°18 C, en presencia del extracto hidroalcohólico de propóleos, se observó que la división celular no se llevó a cabo en su totalidad, por lo que se presentó alteración celular que se evidenció mediante fragmentos celulares y

células bacterianas con mayor longitud al presentado en células bacterianas sin ser sometidas a antimicrobianos y en la Figura N° 18 D, que corresponde a la mezcla, las células perdieron su forma y crecimiento normal, por lo cual se visualizaron fragmentos de las mismas. Para este ensayo se utilizaron las concentraciones de 165.785 $\mu\text{g/mL}$ y 0.060 $\mu\text{g/mL}$ extracto hidroalcohólico de propóleos y ciprofloxacina respectivamente.

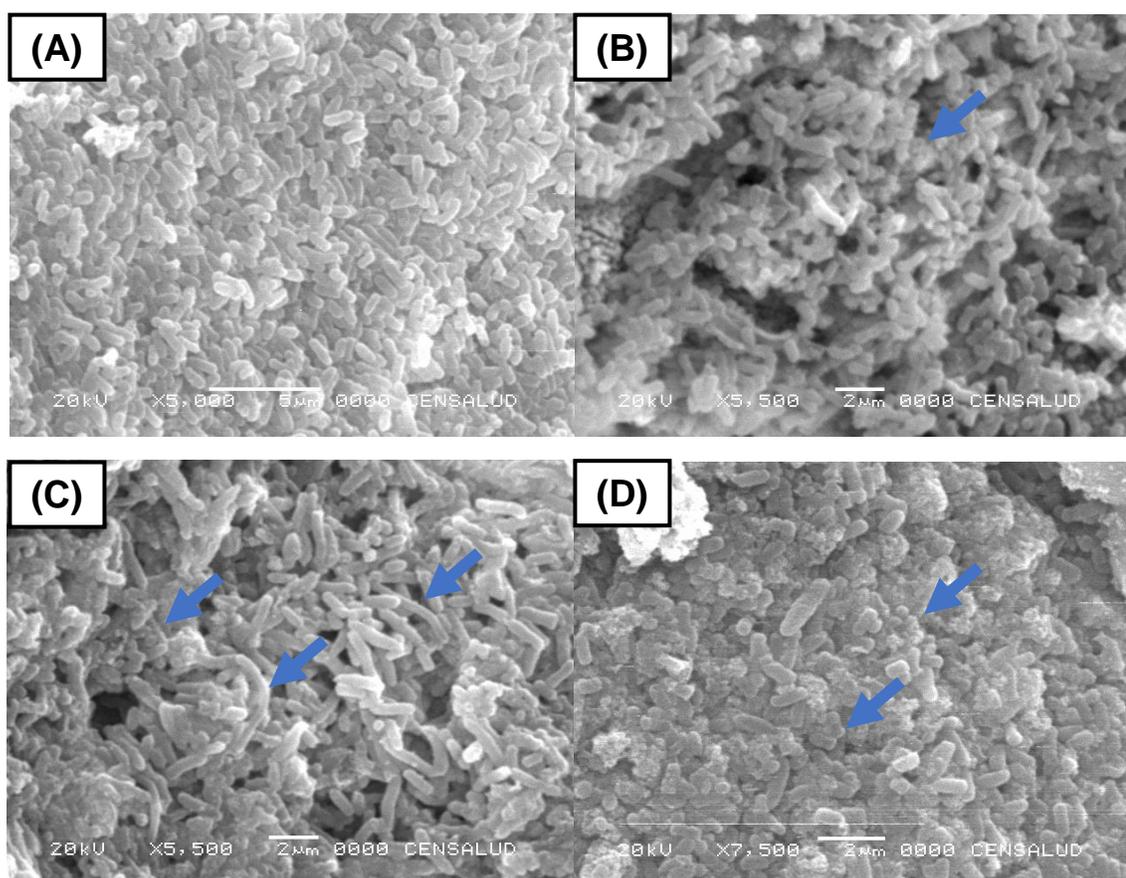
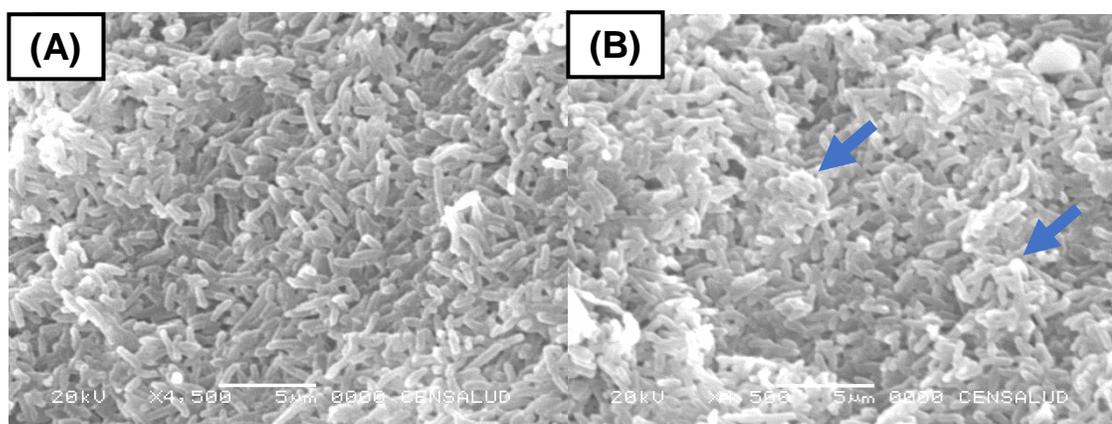


Figura N° 18. Morfología de (A) *Escherichia coli* (B) en presencia de ciprofloxacina (C) extracto hidroalcohólico de propóleos y (D) mezcla.

Para la cepa *Escherichia coli* se encontró en Chanpen *et al* ⁽¹⁴⁾, su morfología vista a través del microscopio electrónico de barrido en la cual se observan las células bacterianas separadas y largas en forma de varilla y con normal crecimiento, caso

similar a la morfología observada en la presente investigación. Se observó la morfología de *Escherichia coli* luego de haber sido expuesta Cardanol, un compuesto aislado a partir de propóleos provenientes de Tailandia; a una concentración de 1.75 $\mu\text{g/mL}$, en la cual se presentó una forma inusual y más pequeña con las células que tienden a agruparse en el cultivo, especialmente en la división celular bacteriana, algunas células parecían dañadas o muertas, de manera similar se observó en esta investigación al someter la cepa de *Escherichia coli* al extracto hidroalcohólico de propóleos a la concentración de 165.785 $\mu\text{g/mL}$.

En la Figura N°19 A, se observó la morfología de *Pseudomonas aeruginosa* bacilar característica; en la Figura N°19 B, en presencia de ciprofloxacina se visualizó la formación de agrupaciones celulares irregulares y daño celular; en la Figura N°19 C, luego de ser expuesta a extracto hidroalcohólico de propóleos se observó la formación de agrupaciones celulares así como la pérdida de la forma bacilar característica de la cepa y en la Figura N°19 D, luego de ser expuesta a la mezcla, se perdió totalmente la morfología, presentándose lesión celular irreversible. Para esta cepa se utilizaron las concentraciones de 110.523 $\mu\text{g/mL}$ y 0.119 $\mu\text{g/mL}$ de extracto hidroalcohólico de propóleos y ciprofloxacina respectivamente.



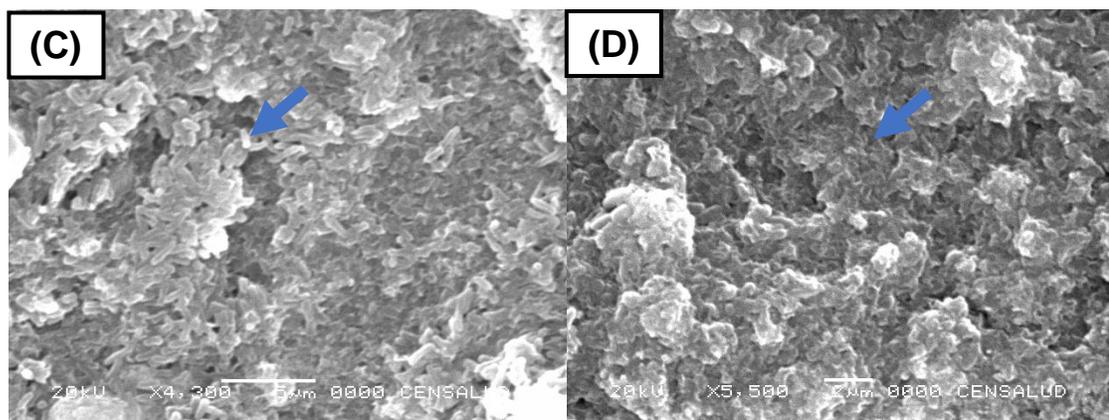


Figura N° 19. Morfología de (A) *Pseudomonas aeruginosa* (B) en presencia de ciprofloxacina (C) de extracto hidroalcohólico de propóleos y (D) mezcla.

En Baron Pichardo ⁽⁵⁾, se encontró la morfología de *Pseudomonas aeruginosa*, observando la forma bacilar de bastón característica de esta bacteria; de forma similar se observó la morfología de esta cepa en la presente investigación.

En Soler Arango ⁽⁵¹⁾, se encontró la morfología de *Pseudomonas aeruginosa* formando biofilms, en la cual se observó la estructura tridimensional compuesta por cúmulos de células y espacios vacíos, rodeadas y entrelazadas por fibras de matriz; la matriz se vio compacta y estructurada. Luego de la exposición del biofilm de *Pseudomonas aeruginosa* a ciprofloxacina a una concentración de 100 µg/mL, se observaron células mayormente sueltas, muchas de ellas deformadas o lisadas y muy poca formación de cúmulos. No se observó una estructura tridimensional ni matriz, por lo cual se podría concluir que ya no se tiene un biofilm. En la presente investigación se observó la morfología de *Pseudomonas aeruginosa* sin formar biofilms, expuesta a ciprofloxacina a la concentración de 0.119 µg/mL, presentándose formación de agrupaciones celulares irregulares y daño celular.

En la Figura N°20 A, se observó la morfología de *Salmonella enterica serovar Typhimurium* en forma de bacilo; en la Figura N°20 B, luego de su exposición a

ciprofloxacina se visualizó alteración en las células bacterianas; en la Figura N°20 C, en presencia de extracto hidroalcohólico de propóleos se observaron células bacterianas agrupadas y dañadas; y en la Figura N°20 D, se visualizaron células en su mayoría con una forma alargada, pudiéndose atribuir esta forma a una división celular incompleta y formando agrupaciones. Para esta cepa se utilizaron las concentraciones de 165.785 $\mu\text{g/mL}$ y 0.060 $\mu\text{g/mL}$ de extracto hidroalcohólico de propóleos y ciprofloxacina respectivamente.

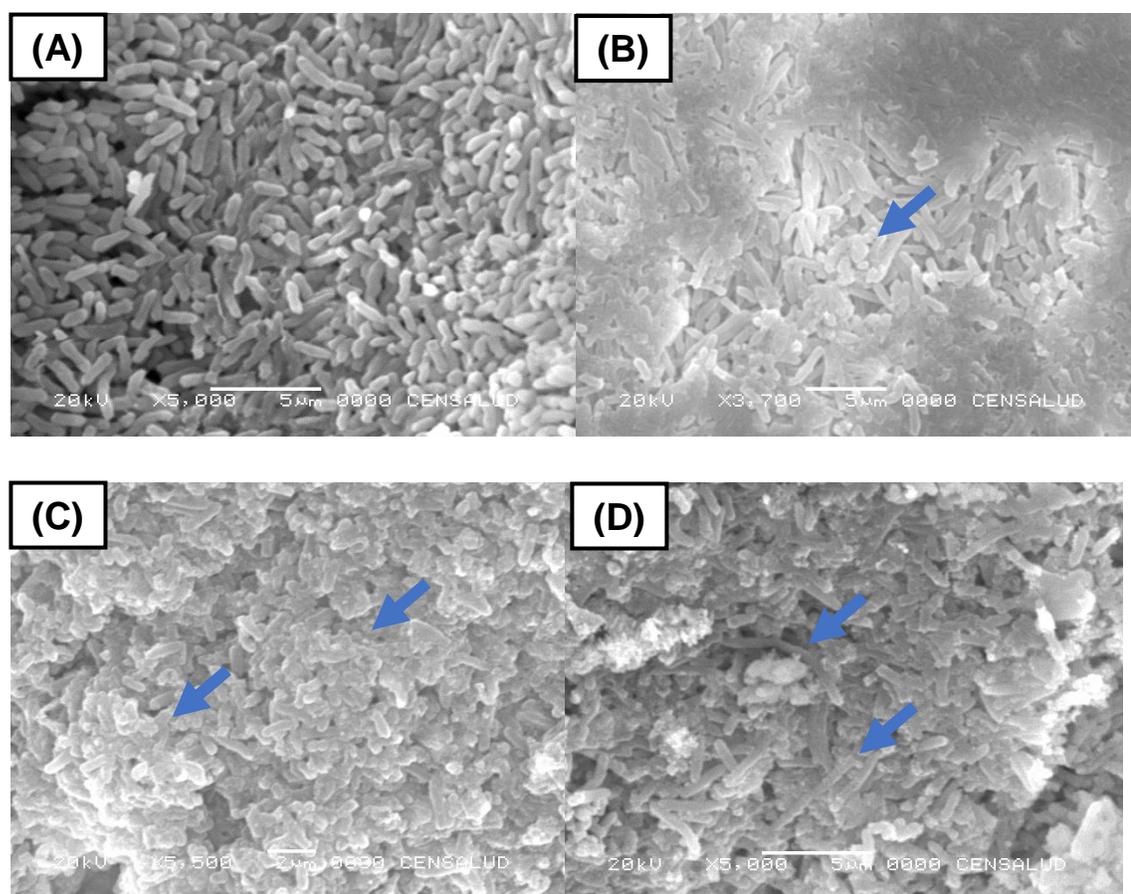


Figura N° 20. Morfología de (A) *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* (B) en presencia de ciprofloxacina (C) extracto hidroalcohólico de propóleos y (D) mezcla.

En Coelho *et al* ⁽¹⁸⁾, se encontró la morfología de *Salmonella enterica serovar Typhimurium*, observándose su forma bacilar característica. En la presente investigación se presentó la morfología de esta cepa de forma similar.

Debido a que no se encontró la morfología de *Salmonella enterica serovar Typhimurium* siendo expuesta a ciprofloxacina, se colocan resultados de morfología celular mostrados en Mattiello *et al* ⁽³³⁾, para *Salmonella enteritidis* luego de ser expuesta a ciprofloxacina a una concentración de 1 µg/mL durante 72 horas, se observó una división de tabique, es decir la formación de nuevas células microbianas por fisión binaria, lo que lleva a sugerir que se pueden encontrar diferentes comportamientos entre las células que forman colonias de distintas morfologías, donde las células pueden exhibir actividad metabólica a diferentes niveles, lo que resulta en diferentes velocidades de crecimiento, aun estando frente a condiciones estresantes para la bacteria en este caso la presencia del antibiótico y puede conllevar a un tipo de resistencia microbiana, lo cual puede ser de especial preocupación para las cepas de *Salmonella* causantes de infecciones invasivas en el ser humano. En esta investigación se visualizó alteración en las células bacterianas de *Salmonella enterica serovar Typhimurium* luego de ser expuesta a ciprofloxacina a una concentración de 0.060 µg/mL.

**CAPITULO VI
CONCLUSIONES**

6.0 CONCLUSIONES

1. Con base a los resultados obtenidos en las diferentes pruebas realizadas a las tres cepas se puede constatar que el extracto hidroalcohólico de propóleos obtuvo mejor actividad antimicrobiana para el ensayo de difusión en agar frente a *Escherichia coli* y obtuvo menor actividad frente a *Pseudomonas aeruginosa*; en el tablero de ajedrez *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* presentaron los valores más bajos de índice de FIC y la que obtuvo mayor valor de índice de FIC, fue *Salmonella enterica serovar Typhimurium*; en cuanto a cinética de muerte la cepa que presentó muerte microbiana en todas las soluciones ensayadas fue *Pseudomonas aeruginosa* y en la microscopía electrónica de barrido, se evidenció que los antimicrobianos utilizados afectan de forma significativa la morfología bacteriana normal de las cepas estudiadas.
2. Se obtuvo un extracto de propóleos seco, de color café claro, el cual fue fácilmente soluble en los disolventes utilizados, con un peso de 9.80 g; y un porcentaje de rendimiento del 49%.
3. En el ensayo de difusión en agar se obtuvo que el extracto hidroalcohólico de propóleos frente a *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella entérica serovar typhimurium* posee actividad antimicrobiana y que las mismas presentan susceptibilidad en presencia de ciprofloxacina.
4. La CMI encontrada en términos de actividad antimicrobiana del extracto hidroalcohólico de propóleos frente a *Escherichia coli* y *Salmonella enterica serovar Typhimurium* se traduce como actividad débil y en el caso de *Pseudomonas aeruginosa* actividad débil a moderada.

5. A partir de la CMI de la mezcla de extracto hidroalcohólico de propóleos y ciprofloxacina para cada una de las cepas estudiadas, el efecto antibiótico de tipo sinérgico predominó en las cepas *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*; por lo cual existe un aumento de la actividad antimicrobiana al utilizar dichos compuestos en combinación.
6. En el caso de la cepa de *Salmonella entérica serovar typhimurium* se produjo un efecto de tipo sumación en el ensayo de tablero de ajedrez, dicha interacción se traduce en que el efecto de la combinación de los antimicrobianos no produce un aumento en su actividad, por lo que el resultado es la sumatoria de sus efectos por separado.
7. La cinética de muerte; en base a la reducción logarítmica evidenció que las cepas *Escherichia coli* y *Salmonella entérica serovar typhimurium* presentaron muerte microbiana con ciprofloxacina y con la mezcla de extracto hidroalcohólico de propóleos y ciprofloxacina; en cuanto a *Pseudomonas aeruginosa* se presentó muerte microbiana con ciprofloxacina, extracto hidroalcohólico de propóleos y la mezcla de extracto hidroalcohólico de propóleos y ciprofloxacina.
8. En la microscopía electrónica de barrido, se evidenció que los antimicrobianos en mezcla ciprofloxacina y extracto hidroalcohólico de propóleos afectan de forma significativa la morfología bacteriana normal de las cepas estudiadas, formándose agrupaciones celulares y pérdida de su morfología característica bacilar.

CAPITULO VII
RECOMENDACIONES

7.0 RECOMENDACIONES

1. Para futuras investigaciones preparar el extracto de propóleos al 10% m/v, para evaluar si al aumentar la concentración del extracto de propóleos se obtienen mejores resultados en cuanto a su actividad antimicrobiana.
2. En estudios posteriores investigar la existencia de posibles extractos de propóleos en formas farmacéuticas presentes en el mercado nacional y estudiar su efecto antimicrobiano.
3. Para los futuros investigadores utilizar cepas bacterianas aisladas de pacientes para evaluar la actividad antimicrobiana de la combinación entre extracto de propóleos y ciprofloxacina y así obtener resultados a partir de cepas silvestres.
4. En investigaciones futuras realizar el estudio con diferentes microorganismos utilizando extracto hidroalcohólico de propóleos y ciprofloxacina con bacterias grampositivas para conocer su espectro de acción antimicrobiana.
5. Para futuros analistas tomar una muestra a partir del ensayo de tablero de ajedrez en los pocillos en los que se muestra muerte microbiana e inocularlos en un medio de cultivo adecuado para verificar estos resultados.
6. Para los futuros investigadores realizar el estudio de cinética de muerte extendiendo el tiempo de incubación hasta 48 y 72 horas, con la finalidad de evaluar el comportamiento de las cepas bacterianas después de las 30 horas, con el objetivo de evidenciar si hay crecimiento bacteriano y si es necesario realizar el ensayo con dosis múltiples para posteriormente poder realizar pruebas *in vivo* a partir de estos resultados.

7. Para análisis posteriores realizar microscopía electrónica de transmisión (TEM) para evidenciar el daño intracelular de los modelos bacterianos en estudio.

BIBLIOGRAFIA

1. L-Ani, Issam; Zimmermann, Stefan; Reichling, Jürgen y Wink, Michael. (2018). Antimicrobial Activities of European Propolis Collected from Various Geographic Origins Alone and in Combination with Antibiotics. *Medicines*, 5, 2.
2. Alemán, Rudis; Ávalos, Brenda y Argueta, Celia. (2013). Determinación de la susceptibilidad a ciprofloxacina en cepas de *Salmonella typhi*, en el cepario del laboratorio nacional de referencia, por el método epsilométrico (e-test) durante el período de julio a septiembre de 2013. Tesis para optar al grado de Licenciada en Laboratorio Clínico, Universidad de El Salvador, El Salvador.
3. Ashour, A.; Raafat, D.; Gowell, H. y Kamel, A. (2015). Green synthesis of silver nanoparticles using cranberry powder aqueous extract: characterization and antimicrobial properties. *International Journal of Nanomedicine*, 10(1), 7207-7221.
4. Baena del Valle, J.A; G., Claudio y Gómez, Doris. (2014). Susceptibilidad antimicrobiana y genotipificación de *Pseudomonas aeruginosa* de pacientes con fibrosis quística y otras patologías en Cartagena, Colombia. *Salud Uninorte*, 30(2), 104-120.
5. Baron Pichardo, Miriam Guadalupe. (2019). Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de Extractos de *Hemiphylacus novogalicianus*. Tesis para optar al grado de Maestro en Farmacia. Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Mexico.

6. Benítez, J. (2012). Caracterización físico-química de propóleos de los municipios de San Julián, La Palma y Corinto. Tesis para optar al grado de Ingeniero Agroindustrial, Universidad Dr. José Matías Delgado, El Salvador.
7. Bonvehí, Josep y Lacalle, Arrate. (2012). The antimicrobial effects of propolis collected in different regions in the Basque Country (Northern Spain). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(1): 1351-1358.
8. Carneiro, Víctor; *et al.* (2020). Antimicrobial and Antibiofilm Activity of Lys-[Trp6]hy-a1 Combined with Ciprofloxacin Against Gram-negative Bacteria. *Protein and peptide letters*, 27: 1-8.
9. Carrillo-Alduenda, JL; Flores-Murrieta, FJ; Rodríguez-Alcocer, AN. (2018). Actualización en la prescripción de fluoroquinolonas. *Med Int Méx*, 34(1), 89-105.
10. Carrillo, M. L.; Castillo, L. N. y Mauricio, R. (2011). Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de Extractos de Propóleos de la Huasteca Potosina (México). *Información Tecnológica*, 22(5), 21–28.
11. Casellas, J.M. (2011). Resistencia a los antibacterianos en América Latina: consecuencias para la infectología. *Rev Panam Salud Publica*, 30(6), 519–28.
12. Castaño, D. Marín y Ramírez, L. Stella. (2009). Metodologías Para Evaluar *in vitro* la Actividad Antibacteriana de Compuestos de Origen Vegetal. *Scientia et Technica*, 42(1), 263-268.
13. Chalkley, L. y Koornhof H. (1985). Antimicrobial Activity of Ciprofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, and *Staphylococcus*

aureus Determined by the Killing Curve Method: Antibiotic Comparisons and Synergistic Interactions. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 28(2): 331-342.

14. Chanpen, Chanchao; Pattaraporn, Boonsai; Preecha, Phuwapraisirisan. (2014). Antibacterial Activity of a Cardanol from Thai *Apis mellifera* Propolis. *International Journal of Medical Sciences*, 11(4): 327-336.
15. Chicas, Diego. (2014). Determinación De Parámetros Físicoquímicos En Mielles Y Propóleos De Distintos Géneros De Abejas Por Medio De Técnicas Electroanalíticas. Tesis para optar al título de Licenciado en Ciencias Químicas, Universidad de El Salvador, El Salvador.
16. Clinical and Laboratory Standards Institute. (2012). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Ninth Edition. CLSI document M07-A9. CLSI, Wayne, PA.
17. Clinical and Laboratory Standards Institute. (2015). Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria; approved guideline. 3rd ed. CLSI guideline M45. CLSI, Wayne, PA.
18. Coelho Trevisan, Daliah Alves; Fiori da Silva, Alex; Negri, Melyssa; Alves de Abreu Filho, Benício; Machinski Junior, Miguel; Patussi, Eliana Valéria; Zanetti Campanerut-Sá, Paula Aline y Graton Mikcha, Jane Martha. (2018). Antibacterial and antibiofilm activity of carvacrol against *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 54(1): 1-8.

19. Creus, E. (2004). Compuestos Fenólicos Un análisis de sus beneficios para la salud. *Ámbito farmacéutico nutrición*, 23(1), 80-84.
20. De la Fuente-Salcido, Norma M; Villarreal-Prieto, Jesús M., Díaz León, Miguel A. y García, Ada. (2015). Evaluación de la actividad de los agentes antimicrobianos ante el desafío de la resistencia bacteriana. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, 46 (2), 7-16.
21. Escobar, M.; M., Lina y Aristizábal, Fabio. (2010). Aplicación De Un Método Fluorométrico Para Evaluar La Proliferación Celular En Líneas Celulares TumORAles. *Vitae, Revista De La Facultad De Química Farmacéutica*, 17 (2), 173-180.
22. Fina, B; Lombarte, M.; Rigalli, A. (2013). Investigación De Un Fenómeno Natural: ¿Estudios *In Vivo*, *In Vitro* O *In Silico*?. *Actualizaciones en Osteología*, 9(3), 239-240.
23. García, Coralith. (2012). Resistencia antibiótica en el Perú y América Latina. *Acta médica peruana*, 29(2), 99-103.
24. Gil, M.; Colarusso, V.; Ferreira, J; Muñoz, A.; Rojas, T.; Ochoa, G.; Perozo, E. y Rojas, G. (2016). Efecto de un extracto etanólico de propóleos sobre *Pseudomonas aeruginosa* en estado planctónico y sésil. *Rev. Salus*, 20(1), 27-33.
25. Gil, M.; Perelli, A.; Alvarado, R.; Arias, Y. y Blumenthal, E. (2012). Actividad bacteriostática y bactericida de la tintura de propóleos sobre bacterias enteropatógenas. *Rev. Salus*, 16(3), 21-25.

26. Gómez L; Calvo A; Prieto J. (2009). *Antibióticos y Quimioterápicos. Generalidades*. En Velásquez (Comp). *Farmacología Básica y Clínica* 18° Edición. (págs.793, 797). Madrid, España. Editorial Médica Panamericana.
27. Gonzalez, P.; Pereira, N.; Soto, Z.; Hernández, E. y Villareal, J. (2014). Aislamiento microbiológico de *Salmonella spp.* y herramientas moleculares para su detección. *Salud Uninorte*, 30(1), 73-94.
28. Horna, G.; Díaz, S.; Taboada, W. y Ortiz, J. (2005). Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de ciprofloxacina en bacterias uropatógenas aisladas en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas. *Rev Med Hered*, 16(1), 39-45.
29. J., Bryan; P., Redden and C., Traba. (2015). The mechanism of action of Russian propolis ethanol extracts against two antibiotic-resistant biofilm-forming bacteria. *Letters in Applied Microbiology*, 62:192-198.
30. Jenkins, Stephen G.; Schuetz y Audrey N. (2012). Current Concepts in Laboratory Testing to Guide Antimicrobial Therapy. *Mayo Clinic Proceedings*, 87(3), 290-308.
31. Lepe Jiménez, JA; et al. (2003). Sensibilidad reducida a ciprofloxacino en los aislados de *Salmonella entérica* de la zona norte de Huelva. *Rev Esp Salud Pública*, 77(1), 761-764.
32. Luengo, T. (2002). Flavonoides. *Ámbito farmacéutico*, 21(4), 108-113.

33. Mattiello D., P.; Wagner, S.; Abreu, M.; Sánchez, A. & Dias, S. (2019). *Salmonella enterica* persister cells form unstable small colony variants after in vitro exposure to ciprofloxacin. *Scientific Reports*, 9: 1-11.
34. Mohammadi Sichani, Maryam; Zeighampour, Farzaneh; Shams, Elaheh y Naghavi, Nafiseh. (2014). Antibacterial Activity of Propolis Ethanol Extract against Antibiotic Resistance Bacteria Isolated from Burn Wound Infections. *Zahedan Journal of research in medical sciences*, 16(3): 25-30.
35. Navarrete, A; Flores, A; Sixtos, C y Reyes, B. (2003) Análisis isobolográfico de la interacción entre α -sanshool, sesamina, asarinina, fagaramida y piperina sobre la actividad larvicida en *Culex quinquefasciatus*. *Revista de la Sociedad Química de México*, 47 (2), 178-185.
36. Opitakorn, A.; Rauytanapanit, M.; Waditee, R. y Praneenararat. (2017). Non-leaching antibacterial cotton fabrics base don lipidated peptides. *RSC Adv*, 7(54), 34267-34275.
37. Padrón G., Alexander; Naranjo D., Adrián; Díaz, José J. y Almenteros, R. (2012). Propóleos una alternativa de todos los tiempos. *Revista Universidad Médica de Pinareña*, 8 (1).
38. Park, Y.; M, Koo.; J., Abreu; M., Ikegaki; J., Cury y P., Rosalen. (1998). Antimicrobial activity of propolis on oral microorganisms. *Current Microbiology*. 36(1), 24-28.
39. Pearson R, Steigbigel R.T, Davis H.T, Chapman S.W. 1980. Method for reliable determination of minimal lethal concentrations. *Antimicrob Agents Chemother*. 38(5): 2065-2072.

40. Pillai, K.; Moellering, Jr. C y Eliopoulos, G. (2005) *Antimicrobial Combinations*. En V. Lorian. (Comp.). *Antibiotics in Laboratory Medicine* 5th Edition. (págs. 365-405). Philadelphia, PA USA. Editorial Williams & Wilkins.
41. Paz, V.; Magwani, S.; Martínez, A.; Álvarez, D.; Solano, S. y Vázquez, R. *Pseudomonas aeruginosa*: patogenicidad y resistencia antimicrobiana en la infección urinaria. *Revista Chilena de Infectología*, 36(2), 180-189.
42. Reyes-Jurado, F.; Palou, E. y López-Malo, A. (2014). Métodos de evaluación de la actividad antimicrobiana y de determinación de los componentes químicos de los aceites esenciales. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 8(1), 68-78.
43. Rivera, L.; Motta, P.; Cerón, M.; Chimonja, F. (2012). Resistencia de la *Salmonella* a los antimicrobianos convencionales para su tratamiento. *Rev CES Med Vet Zotec*, 7(1), 115-127.
44. Rodríguez, Guadalupe. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud pública de México*, 44(5), 464-475.
45. Romeu, B. (2012). Caracterización de cepas de *Escherichia coli* de importancia clínica humana aisladas de ecosistemas dulceacuícolas de la habana. Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas, Universidad de la Habana, Cuba.
46. Rosas, S; Greta. H. (2019). Microscopía electrónica de barrido y microanálisis de elementos del Clúster Científico y Tecnológico BioMimic. Consultado el 10

de Septiembre de 2020. Disponible en: <https://www.inecol.mx/inecol/index.php/es/ct-menu-item-25/ct-menu-item-27/17-ciencia-hoy/723-microscopia-electronica-de-barrido-y-microanalisis-de-elementos-del-cluster-cientifico-y-tecnologico-biomimic>.

47. S., Rejane; Machado, B.; Barreto, G.; Costa, S.; Andrade, L.; Amaral, G.; Carvalho, A.; Padilha, F.; Barbosa, J. y Umsza-Guez, M. (2017) Antioxidant, antimicrobial, antiparasitic, and cytotoxic properties of various Brazilian propolis extracts. *Plos one*, 12(3), e0172585.
48. Shahbaz, M.; Zahoor, T.; Randhawa, Mohammad y Nawaz, H. (2015). In-vitro antibacterial activity of hydroalcoholic extract of propolis against pathogenic bacteria. *Pakistan Journal of Life and Social Sciences*, 13(3): 132-136.
49. Shields, Ryan K.; Kwak, Eun J.; Potoski, Brian A.; Adams, J.; Silveira, F.; Toyoda, Y.; Pilewski, J.; Crespo, M.; Pasculle, A.; Clancy, C. y Nguyen, M. (2011). High mortality rates among solid organ transplant recipients infected with extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii*: using *in vitro* antibiotic combination testing to identify the combination of a carbapenem and colistin as an effective treatment regimen. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, Antimicrobial Susceptibility Studies*, 70(2): 246 –252.
50. Singh, Aman; Prabha, Vijay y Rishi, Praveen. (2014). Efficacy of Cryptdin-2 as an Adjunct to Antibiotics from Various Generations Against *Salmonella*. *Indian Journal Microbiology*, 54(3): 323-328.
51. Soler Arango, J. (2018). Inactivación de biofilms de *Pseudomonas aeruginosa* mediante plasma frío a presión atmosférica. Tesis para optar al grado de

Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas en área de Ciencias Biológicas.
Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

52. Velásquez, B y Montenegro, S. (2017). Actividad antimicrobiana de extractos etanólicos de propóleos obtenidos de abejas *Apis mellifera*. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 8(1), 185-193.
53. Viganor, L; Araújo, M; Santos, K y Nunes, A. (2011). Evaluation of the synergistic potential of vancomycin combined with other antimicrobial agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative *Staphylococcus spp.* Strains. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 106(1), 44-50.
54. Wang, YC. (2014). Medicinal plant activity on *Helicobacter pylori* related diseases. *World Journal of Gastroenterology*, 20(30), 10368.

GLOSARIO

Bactericida: Es la sustancia que provoca la muerte bacteriana y, por consiguiente, el proceso es irreversible. También se entiende como la reducción de 3 log con respecto a la concentración inicial del microorganismo en estudio.

(35) (12)

Bacteriostático: Es la sustancia que bloquea el desarrollo y la multiplicación de las bacterias, pero no provoca su muerte, por lo cual su efecto es reversible. (27)

Bombas de eflujo: Sistema de bombeo activo asociado a la membrana bacteriana que produce la salida del fármaco por expulsión activa. (27)

Compuestos fenólicos: Engloba a todas aquellas sustancias que poseen varias funciones fenol, nombre popular del hidroxibenceno, unidas a estructuras aromáticas o alifáticas. (20)

Flavonoides: Es un grupo de moléculas generadas por el metabolismo secundario de los vegetales, que, como otros principios activos vegetales, se originan mediante una ruta biosintética mixta (en el caso de los flavonoides, a través de la ruta del ácido shikímico y la ruta de los policétidos). (33)

In Vitro: Experimentos realizados en dispositivos de laboratorio utilizando tejidos, células o moléculas provenientes de especies animales o microorganismos. (23)

In Vivo: Experimento que se lleva a cabo con especies animales. (23)

Isoblograma: Es una gráfica en coordenadas rectangulares de pares de dosis o concentraciones de las sustancias respectivas que producen un nivel determinado de efecto para la determinación del tipo de interacción. (33)

Patógeno: es todo agente que puede producir enfermedad o daño a la biología de un huésped, sea este humano, animal o vegetal. (2)

Resistencia antimicrobiana: Es la capacidad de las bacterias u otros microorganismos para contrarrestar el efecto de algún antibiótico; esta resistencia sobreviene cuando la bacteria sufre algún cambio que reduce o elimina la efectividad de antibiótico, compuestos químicos o cualquier otro agente destinado para curar o prevenir alguna infección. ⁽²¹⁾

ANEXOS

ANEXO N°1

**ELUCIDACIÓN DE LOS COMPUESTOS MAYORITARIOS PRESENTES EN
EL PROPÓLEO DE CHILANGA MORAZAN, REALIZADOS POR LA
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA**



Figura N° 21. Extracto de propóleos seco procedente de Chilanga Morazán.

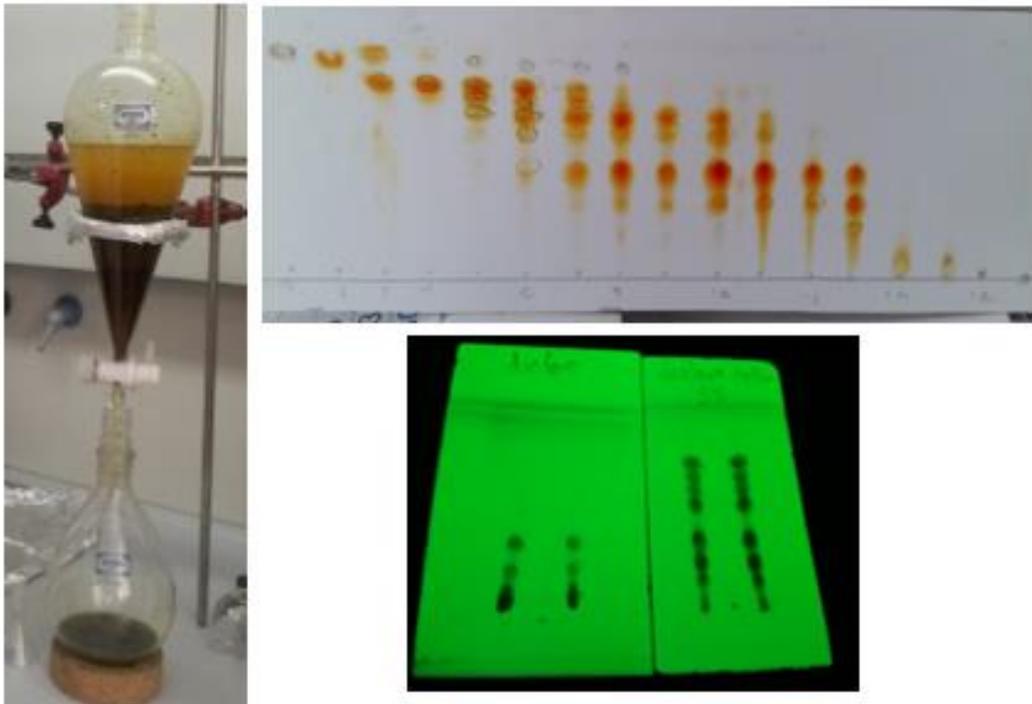
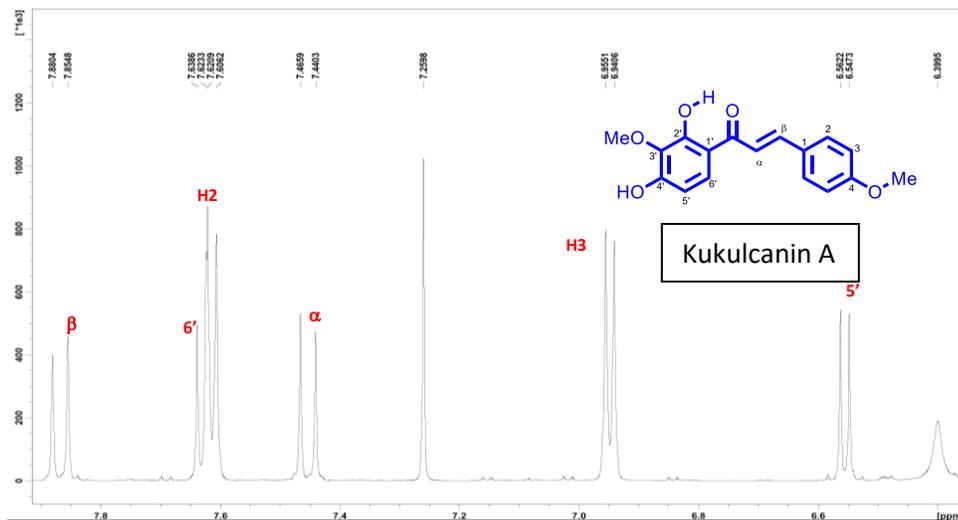
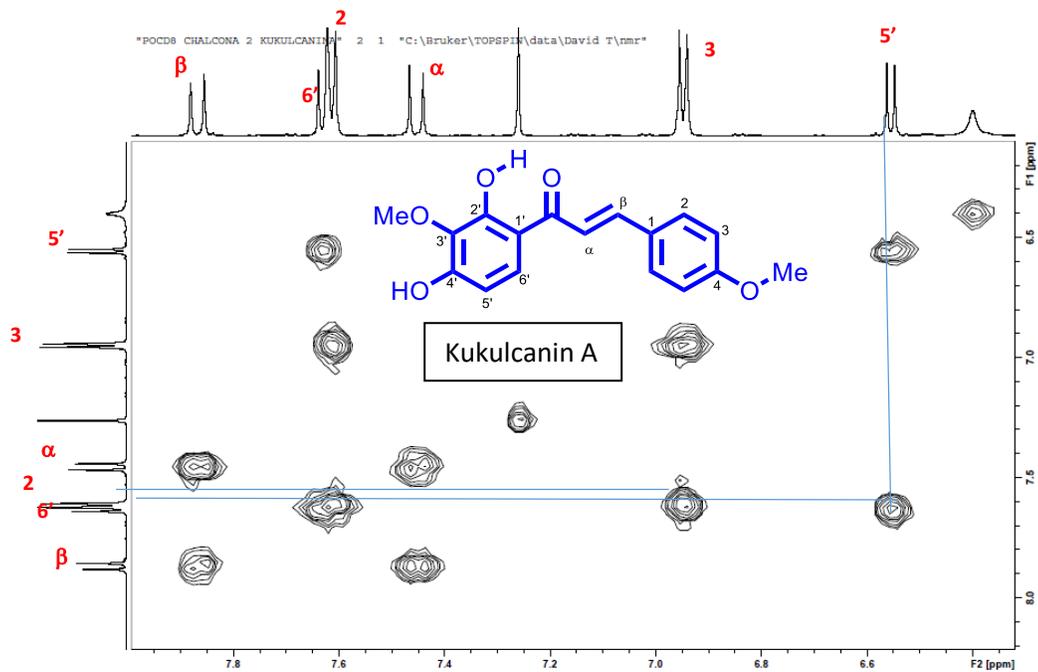


Figura N°22. Separación de los compuestos mayoritarios extracto diclorometánico, haciendo uso de técnicas cromatográficas (CF y CC).



Espectro de RMN ^1H 600 MHz fracción POCD-8 propóleos de Chilanga



Experimento COSY 600MHz de fracción POCD-8 propóleos de Chilanga

Figura N°23. Caracterización mediante técnicas RMN, IR y UV de los compuestos mayoritarios y estructura de Kukulcanin A.

ANEXO N°2.

MATERIAL, EQUIPO, REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO.

Materiales

- Tubos de ensayo con rosca
- Asa bacteriológica en punta
- Mechero bunsen
- Malla de asbesto
- Trípode
- Gradilla para tubos de ensayo
- Perlas de ebullición
- Placas de petri estériles
- Papel kraft
- Probeta de 50 mL
- Probeta de 100 mL
- Probeta de 25 mL
- Erlenmeyer de 250 mL
- Agitador de vidrio
- Balanza semianalítica
- Beaker de 2000 mL
- Probeta de 1000 mL
- Papel glassine
- Papel carbón
- Embudo de vidrio
- Papel filtro poro grueso
- Tubos de microcentrífuga
- Liofilizador
- Portaobjetos
- Cubreobjetos
- Bandeja metálica
- Micropipeta multicanal
- Puntas para micropipeta de 200 μ L
- Puntas para micropipeta de 1000 μ L
- Bandejas de 96 pocillos
- Balón volumétrico de 10 mL
- Balón volumétrico de 25 mL
- Beaker de 50 mL
- Beaker de 100 mL
- Frasco lavador

Equipo

- Agitador magnético
- Hot plate
- Espectrofotómetro UV
- Incubadora
- Ultrasonicador
- Rotaevaporador
- Microcentrifugadora
- Microscopio
- Cuenta colonias
- Congelador
- Microscopio electrónico de barrido

Reactivos

- Etanol al 70%
- Metanol
- Dimetilsulfóxido
- Agua Estéril
- Resazurina al 0.01%

Medios de Cultivo

- Caldo Nutritivo
- Agar Nutritivo
- Solución Salina Estéril
- Agar Mueller-Hinton
- Caldo BHI

ANEXO N°3

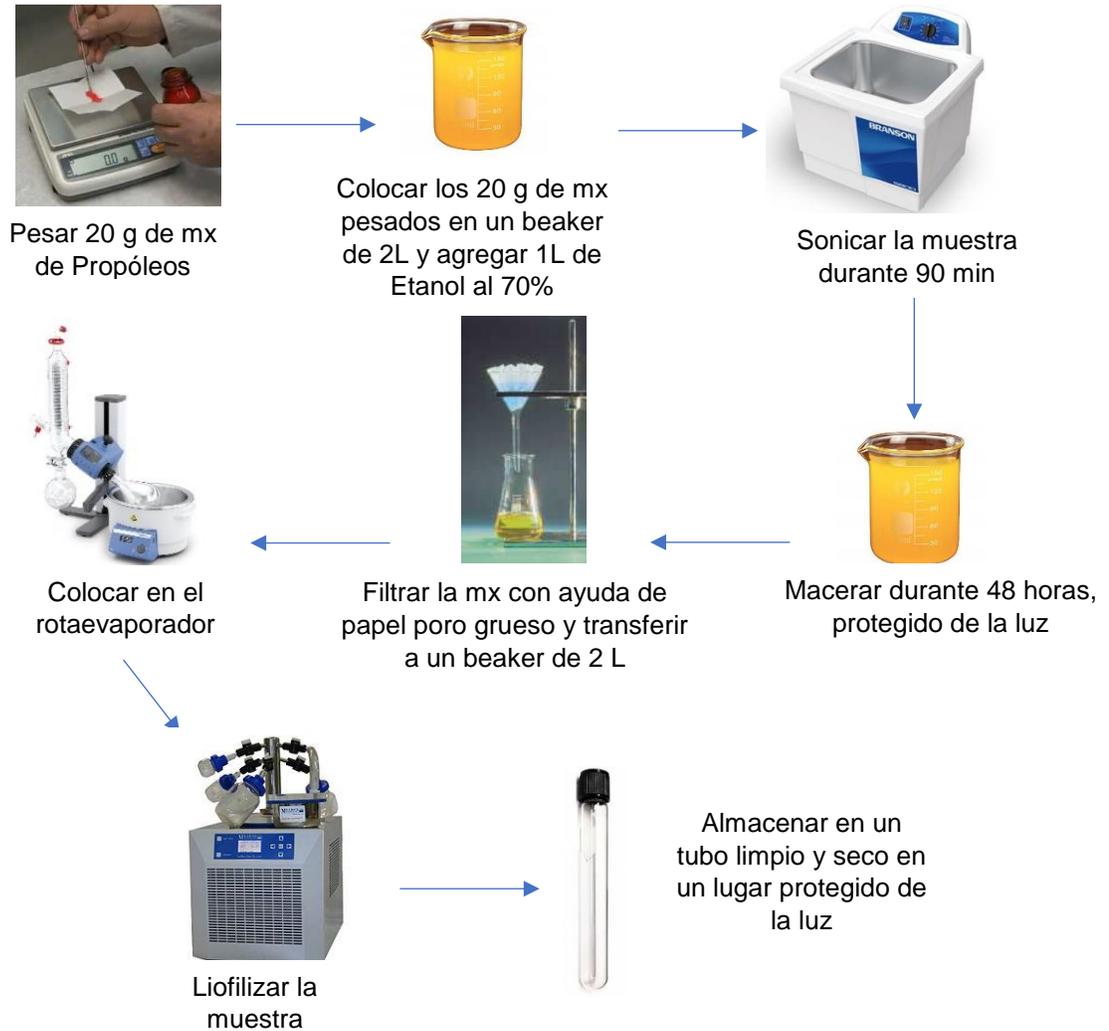


Figura N°24. Preparación del extracto hidroalcohólico de propóleos al 2%*m/v*.

ANEXO N°4



Figura N°25. Cultivo de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*

ANEXO N°5

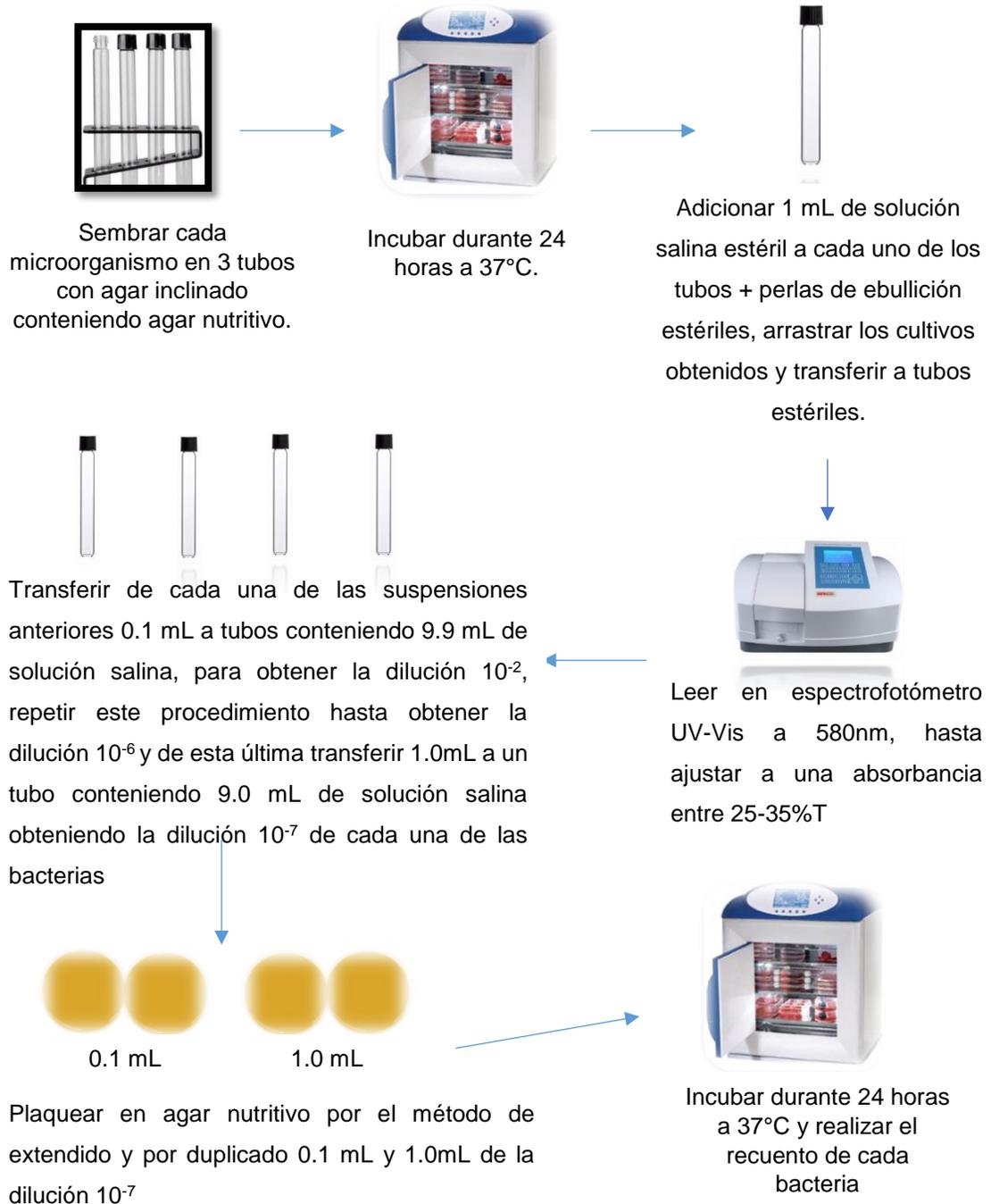


Figura N°26. Estandarización de inóculo de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella enterica serovar Typhimurium* y verificación de su concentración mediante recuento en placa.

ANEXO N°6

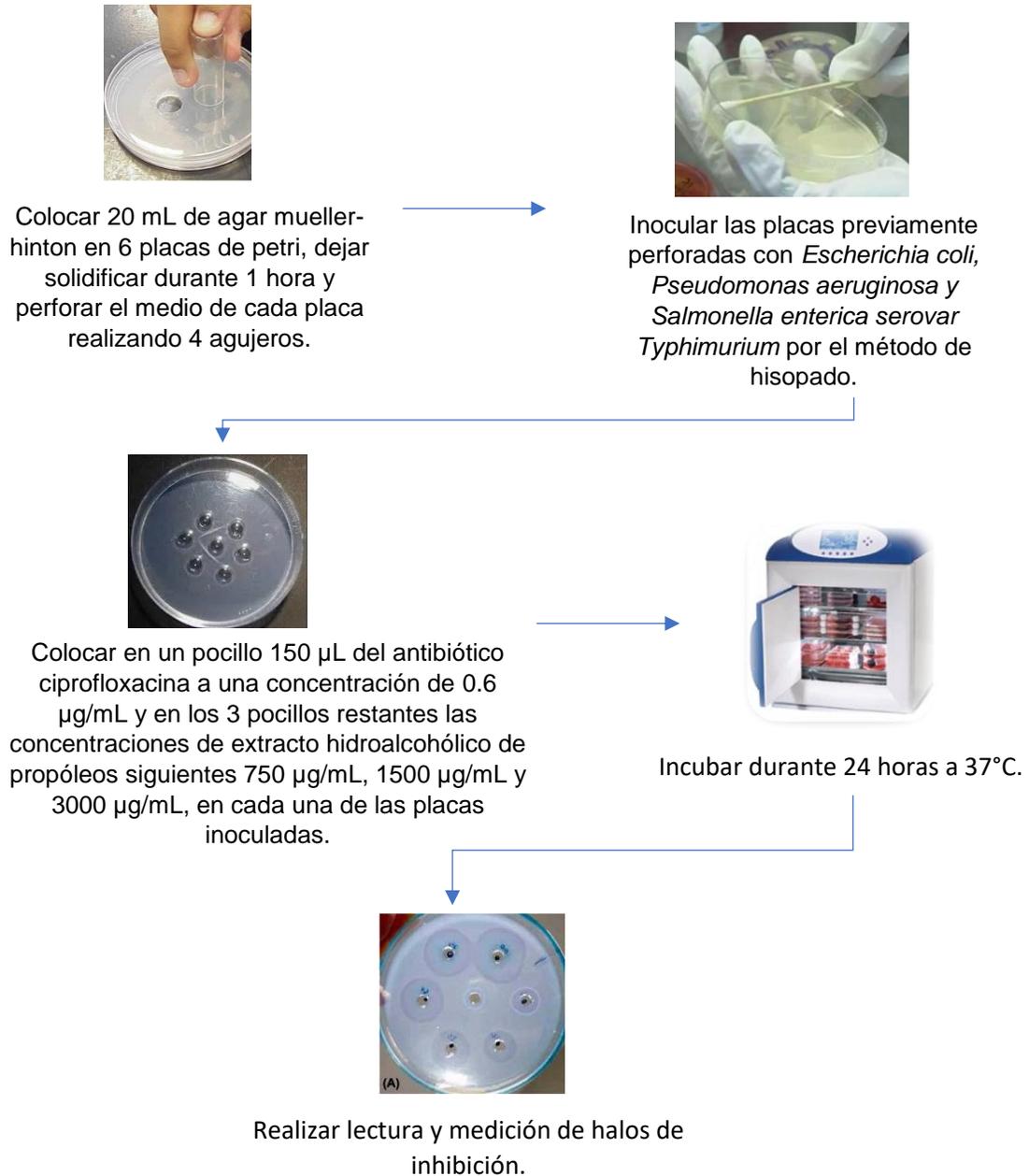


Figura N°27. Evaluación de la actividad antibacteriana de ciprofloxacina y el extracto hidroalcohólico de propóleos contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella enterica serovar Typhimurium* mediante la técnica de difusión en agar.

ANEXO N°7



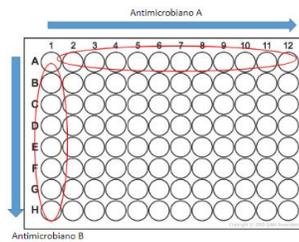
Realizar las diluciones del extracto de propóleos con DMSO al 10% y de los antibióticos Ciprofloxacina y Amoxicilina con agua estéril hasta obtener las concentraciones correspondientes (partiendo de soluciones madre)



Extracto de propóleos: Solución madre de 14100 µg
Ciprofloxacina: Solución madre 1000 µg/mL
Amoxicilina: Solución madre 1060 µg/mL



Colocar en cada pocillo: 100 µL de caldo BHI, 100 µL de extracto de propóleos a la concentración respectiva, ciprofloxacina o amoxicilina y 10 µL de cada cepa ATCC en estudio a la concentración de 1×10^8 UFC/mL.



Partiendo de las diluciones realizadas llenar la placa de 96 pocillos de la siguiente manera: filas 1, 7 y 4 colocar ciprofloxacina, 2, 5 y 8 amoxicilina, 3, 6 y 9 extracto de propóleos, fila 10 control positivo de crecimiento, y en 11 y 12 el control negativo.



Incubar la placa por 24 horas a 37°C



Agregar 10 µL de Resazurina e incubar durante 2 horas

Realizar lectura de CMI

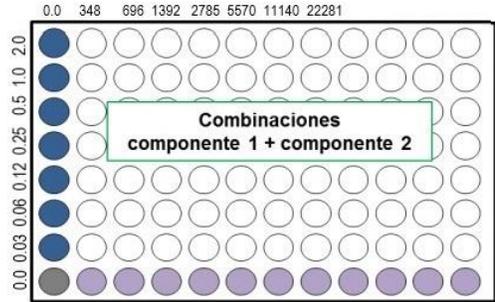
Figura N° 28. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria por Microdilución de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella enterica serovar Typhimurium*.

ANEXO N°8



Realizar las respectivas diluciones 3 veces por encima y por debajo de la CMI del antibiótico ciprofloxacina y el extracto de propóleos.

Ciprofloxacina



Extracto Hidroalcolico de Propoleos

Llenar la placa de 96 pocillos como se muestra en el esquema (Ejemplo tomado del ensayo realizado para *Salmonella enterica serovar Typhimurium*)

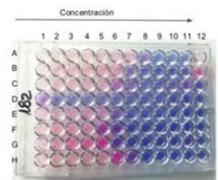


Colocar en cada pocillo: 100 μ L de caldo BHI al 1%, 100 μ L de extracto de propóleos a la concentración respectiva, de ciprofloxacina o de la mezcla de ambos y 10 μ L de las cepas ATCC en estudio a la concentración de 1×10^8 UFC/mL

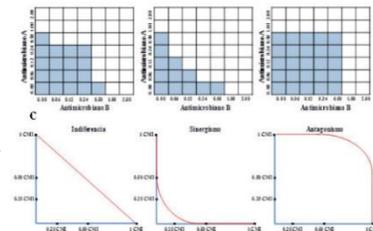
Incubar a 37°C durante 24 horas



Agregar en cada pocillo 25 μ L del indicador resazurina e incubar 2 horas



Visualizar el cambio de color en los pocillos



Construir el isoblograma y calcular la concentración fraccional inhibitoria.

Figura N°29. Determinación del Efecto Antibiótico Mediante el Método de Tablero de Ajedrez.

ANEXO N°9

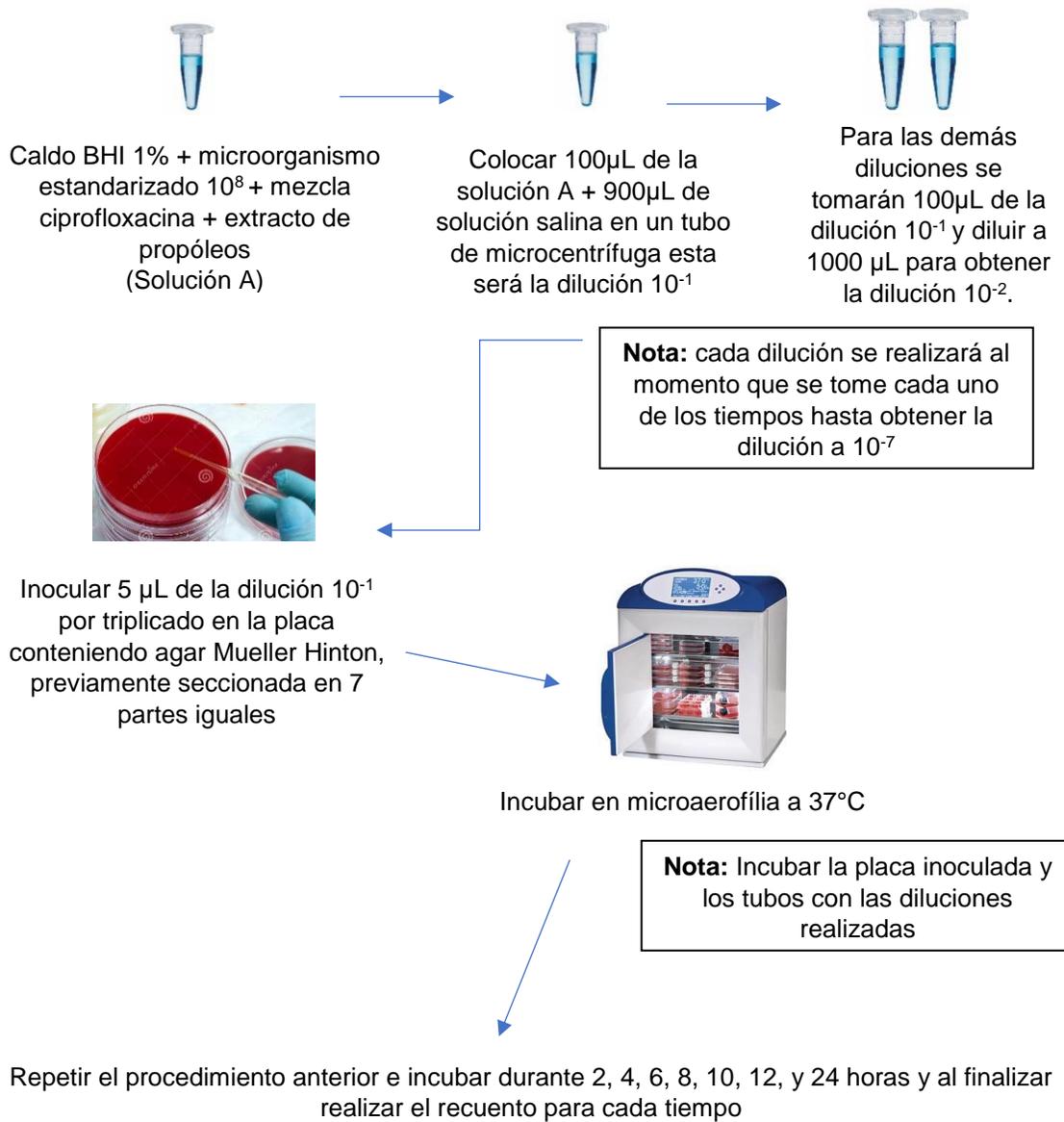


Figura N° 30. Cinética de Muerte

ANEXO N°10

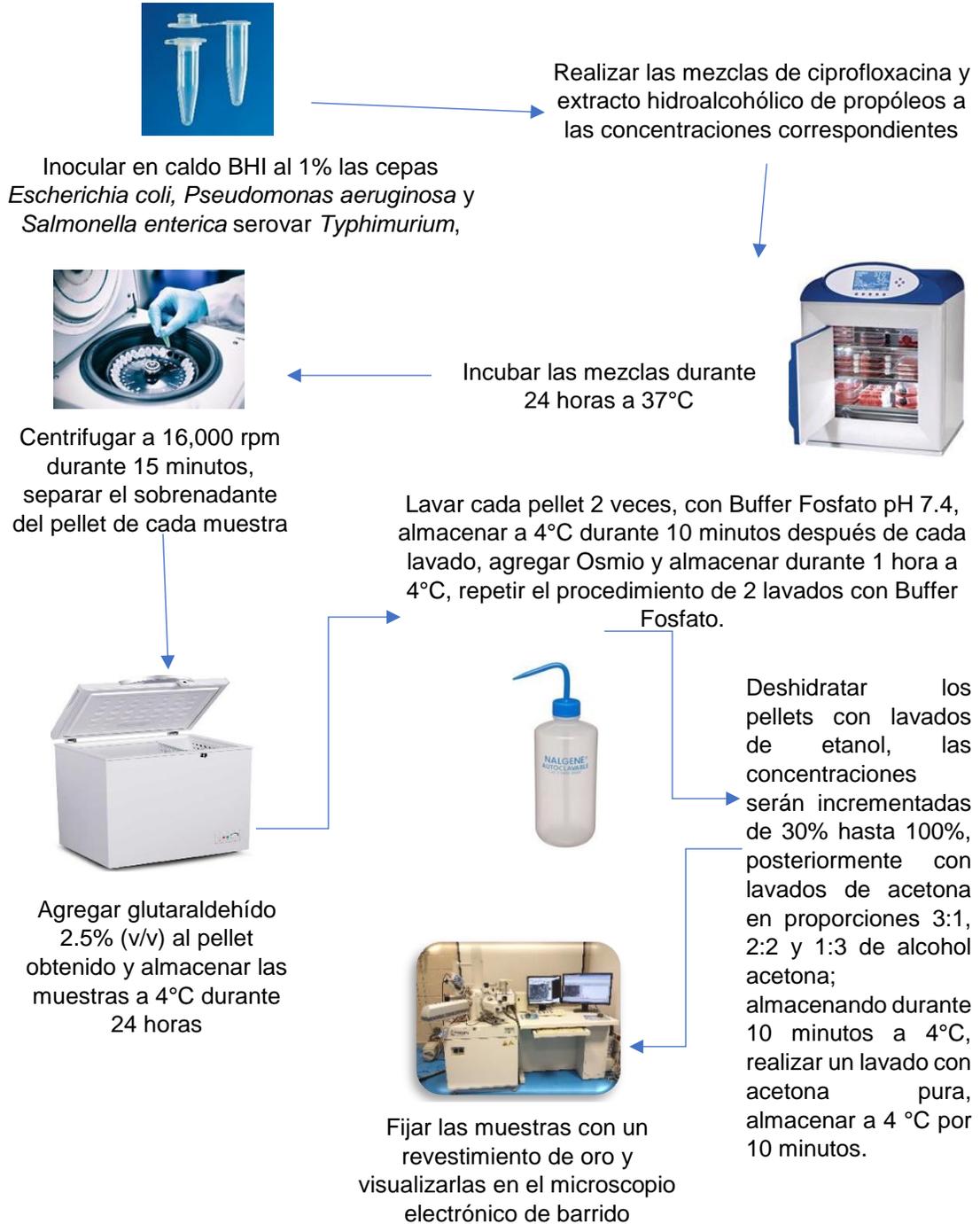


Figura N° 31. Microscopía Electrónica de Barrido

ANEXO N°11

**PROCEDIMIENTO DE PREPARACIÓN DEL EXTRACTO
HIDROALCOHÓLICO DE PROPÓLEOS AL 2% M/V.**

1. Colocar 20 g de Propóleos en beaker conteniendo 1000 mL de Etanol al 70%



2. Sonicar durante 90 minutos



3. Macerar durante 24 horas



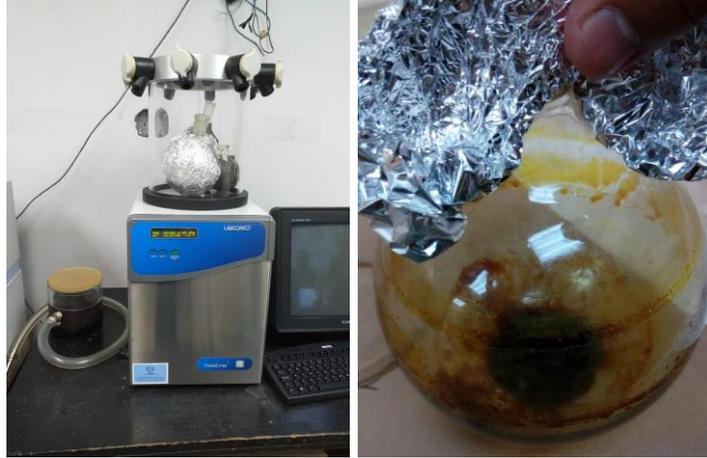
4. Filtrar con papel filtro de poro grueso



5. Colocar en rotaevaporador hasta eliminar la mayor parte del alcohol



6. Liofilizar la muestra



ANEXO N°12

RESULTADOS OBTENIDOS DE TABLERO DE AJEDREZ

Los resultados mostrados en este anexo corresponden a las concentraciones obtenidas en el ensayo de tablero de ajedrez las cuales representan los pocillos en los que hubo inhibición del crecimiento bacteriano; los isobogramas se construyeron a partir de los mismos.

Cuadro N° 5. Resultados de la determinación del efecto antibiótico mediante el método de tablero de ajedrez de *Escherichia coli*.

Propóleos (µg/mL)	Ciprofloxacina (µg/mL)
0	0.119
165.785	0.06
331.569	0.03
663.138	0.03
1326.276	0.03
2652.552	0.03
5305.105	0

Cuadro N° 6. Resultados de la determinación del efecto antibiótico mediante el método de tablero de ajedrez de *Pseudomonas aeruginosa*.

Propóleos (µg/mL)	Ciprofloxacina (µg/mL)
0	0.119
110.523	0.119
221.045	0.119
442.09	0.119
884.181	0.06
1768.362	0.06
7073.448	0

Cuadro N° 7. Resultados de la determinación del efecto antibiótico mediante el método de tablero de ajedrez de *Salmonella enterica serovar Typhimurium*.

Propóleos (µg/mL)	Ciprofloxacina (µg/mL)
0	0.238
165.785	0.06
331.569	0.06
663.138	0.06
1326.276	0.06
2652.552	0

ANEXO N°13

RESULTADOS DEL ENSAYO DE CINÉTICA DE MUERTE

Cuadro N° 8. Resultados del ensayo de cinética de muerte para *Escherichia coli* en ausencia de antimicrobianos.

Tiempo	R 1	R 2	R 3	σ	Promedio en 5 μL	Promedio para 1000 μL	FD (100)	Log	Red
0	6500	6500	6500	0	6500	1300000	130000000	8.11	0.00
2	6500	6500	6500	0	6500	1300000	130000000	8.11	0.00
4	6500	6500	6500	0	6500	1300000	130000000	8.11	0.00
6	6500	6500	6500	0	6500	1300000	130000000	8.11	0.00
8	6500	6500	6500	0	6500	1300000	130000000	8.11	0.00
10	6500	6500	6500	0	6500	1300000	130000000	8.11	0.00
12	53	50	40	7	48	9533	953333	5.98	2.13
24	18	15	20	3	18	3533	353333	5.55	2.57
26	10	11	11	1	11	2133	213333	5.33	2.78
30	13	12	12	1	12	2467	246667	5.39	2.72

σ : Desviación estándar.

FD: Factor de dilución

R: Resultado

Cuadro N° 9. Resultados del ensayo de cinética de muerte para *Escherichia coli* en combinación con Ciprofloxacina.

Tiempo	R 1	R 2	R 3	σ	Promedio en 5 μ L	Promedio para 1000 μ L	FD (100)	Log	Red
0	6500	6500	6500	0	6500	1300000	130000000	8.11	0.00
2	6500	6500	6500	0	6500	1300000	130000000	8.11	0.00
4	39	40	41	1	40	8000	800000	5.90	2.21
6	47	38	30	9	38	7667	766667	5.88	2.23
8	34	27	30	4	30	6067	606667	5.78	2.33
10	24	23	28	3	25	5000	500000	5.70	2.41
12	15	16	11	3	14	2800	280000	5.45	2.67
24	10	8	9	1	9	1800	180000	5.26	2.86
26	7	6	5	1	6	1200	120000	5.08	3.03
30	6	6	7	1	6	1267	126667	5.10	3.01

Cuadro N° 10. Resultados del ensayo de cinética de muerte para *Escherichia coli* en combinación con Extracto Hidroalcohólico de Propóleos.

Tiempo	R 1	R 2	R 3	σ	Promedio en 5 μL	Promedio para 1000 μL	FD (100)	Log	Red
0	6500	6500	6500	0	6500	1300000	130000000	8.11	0.00
2	6500	6500	6500	0	6500	1300000	130000000	8.11	0.00
4	6500	6500	6500	0	6500	1300000	130000000	8.11	0.00
6	6500	6500	6500	0	6500	1300000	130000000	8.11	0.00
8	6500	6500	6500	0	6500	1300000	130000000	8.11	0.00
10	65	64	68	2	66	13133	1313333	6.12	2.00
12	43	42	40	2	42	8333	833333	5.92	2.19
24	35	40	38	3	38	7533	753333	5.88	2.24
26	11	10	10	1	10	2067	206667	5.32	2.80
30	11	11	10	1	11	2133	213333	5.33	2.78

Cuadro N° 11. Resultados del ensayo de cinética de muerte para *Escherichia coli* en combinación con la mezcla Ciprofloxacina y Extracto Hidroalcohólico de Propóleos.

Tiempo	R 1	R 2	R 3	σ	Promedio en 5 μ L	Promedio para 1000 μ L	FD (100)	Log	Red
0	6500	6500	6500	0	6500	1300000	130000000	8.11	0.00
2	6500	6500	6500	0	6500	1300000	130000000	8.11	0.00
4	6500	6500	6500	0	6500	1300000	130000000	8.11	0.00
6	24	31	27	4	27	5467	546667	5.74	2.38
8	33	30	32	2	32	6333	633333	5.80	2.31
10	41	30	27	7	33	6533	653333	5.82	2.30
12	20	21	24	2	22	4333	433333	5.64	2.48
16	19	18	19	1	19	3733	373333	5.57	2.54
18	15	15	12	2	14	2800	280000	5.45	2.67
20	12	16	11	3	13	2600	260000	5.41	2.70
22	8	10	9	1	9	1800	180000	5.26	2.86
24	10	7	11	2	9	1867	186667	5.27	2.84
26	15	15	12	2	14	2800	280000	5.45	2.67
30	22	15	15	4	17	3467	346667	5.54	2.57

Cuadro N° 12. Resultados del ensayo de cinética de muerte para *Pseudomonas aeruginosa* en ausencia de antimicrobianos.

Tiempo	R 1	R 2	R 3	σ	Promedio en 5 μL	Promedio para 1000 μL	FD (100)	Log	Red
0	6500	6500	6500	0	6500	1300000	130000000	8.11	0.00
2	6500	6500	6500	0	6500	1300000	130000000	8.11	0.00
4	6500	6500	6500	0	6500	1300000	130000000	8.11	0.00
6	6500	6500	6500	0	6500	1300000	130000000	8.11	0.00
8	6500	6500	6500	0	6500	1300000	130000000	8.11	0.00
10	6500	6500	6500	0	6500	1300000	130000000	8.11	0.00
12	32	33	28	3	31	6200	620000	5.79	2.32
24	15	12	11	2	13	2533	253333	5.40	2.71
26	12	15	13	2	13	2667	266667	5.43	2.69
30	10	10	10	0	10	2000	200000	5.30	2.81

Cuadro N° 13. Resultados del ensayo de cinética de muerte para *Pseudomonas aeruginosa* en combinación con Ciprofloxacina

Tiempo	R 1	R 2	R 3	σ	Promedio en 5 μL	Promedio para 1000 μL	FD (100)	Log	Red
0	6500	6500	6500	0	6500	1300000	130000000	8.11	0.00
2	33	25	25	5	28	5533	553333	5.74	2.37
4	6	9	8	2	8	1533	153333	5.19	2.93
6	6	6	8	1	7	1333	133333	5.12	2.99
8	10	11	12	1	11	2200	220000	5.34	2.77
10	6	8	8	1	7	1467	146667	5.17	2.95
12	5	2	3	2	3	667	66667	4.82	3.29
24	3	2	4	1	3	600	60000	4.78	3.34
26	1	2	1	1	1	267	26667	4.43	3.69
30	1	1	1	0	1	200	20000	4.30	3.81

Cuadro N° 14. Resultados del ensayo de cinética de muerte para *Pseudomonas aeruginosa* en combinación con Extracto Hidroalcohólico de Propóleos.

Tiempo	R 1	R 2	R 3	σ	Promedio en 5 μL	Promedio para 1000 μL	FD (100)	Log	Red
0	6500	6500	6500	0	6500	1300000	130000000	8.11	0.00
2	6500	6500	6500	0	6500	1300000	130000000	8.11	0.00
4	6500	6500	6500	0	6500	1300000	130000000	8.11	0.00
6	6500	6500	6500	0	6500	1300000	130000000	8.11	0.00
8	15	13	15	1	14	2867	286667	5.46	2.66
10	10	10	9	1	10	1933	193333	5.29	2.83
12	12	11	13	1	12	2400	240000	5.38	2.73
24	13	13	11	1	12	2467	246667	5.39	2.72
26	6	5	4	1	5	1000	100000	5.00	3.11
30	8	7	7	1	7	1467	146667	5.17	2.95

Cuadro N° 15. Resultados del ensayo de cinética de muerte para *Pseudomonas aeruginosa* en combinación con la mezcla Ciprofloxacina y Extracto Hidroalcohólico de Propóleos.

Tiempo	R 1	R 2	R 3	σ	Promedio en 5 μ L	Promedio para 1000 μ L	FD (100)	Log	Red
0	6500	6500	6500	0	6500	1300000	130000000	8.11	-
2	27	26	28	1	27	5400	540000	5.73	2.38
4	15	15	16	1	15	3067	306667	5.49	2.62
6	12	12	14	1	13	2533	253333	5.40	2.71
8	17	14	14	2	15	3000	300000	5.48	2.63
10	9	7	8	1	8	1600	160000	5.20	2.91
12	2	1	3	1	2	400	40000	4.60	3.51
16	9	8	8	1	8	1667	166667	5.22	2.89
18	13	14	15	1	14	2800	280000	5.45	2.66
20	12	11	9	2	11	2133	213333	5.33	2.78
22	11	13	12	1	12	2400	240000	5.38	2.73
24	12	15	10	3	12	2467	246667	5.39	2.72
26	13	11	15	2	13	2600	260000	5.41	2.70
30	10	9	8	1	9	1800	180000	5.26	2.85

Cuadro N° 16. Resultados del ensayo de cinética de muerte para *Salmonella enterica serovar Typhimurium* en ausencia de antimicrobianos

Tiempo	R 1	R 2	R 3	σ	Promedio en 5 μ L	Promedio para 1000 μ L	FD (100)	Log	Red
0	6500	6500	6500	0	6500	1300000	130000000	8.11	0.00
2	6500	6500	6500	0	6500	1300000	130000000	8.11	0.00
4	6500	6500	6500	0	6500	1300000	130000000	8.11	0.00
6	6500	6500	6500	0	6500	1300000	130000000	8.11	0.00
8	6500	6500	6500	0	6500	1300000	130000000	8.11	0.00
10	6500	6500	6500	0	6500	1300000	130000000	8.11	0.00
12	34	23	24	6	27	5400	540000	5.73	2.38
24	14	15	12	2	14	2733	273333	5.44	2.68
26	13	12	11	1	12	2400	240000	5.38	2.73
30	14	16	13	2	14	2867	286667	5.46	2.66

Cuadro N° 17. Resultados del ensayo de cinética de muerte para *Salmonella enterica serovar Typhimurium* en combinación con Ciprofloxacina.

Tiempo	R 1	R 2	R 3	σ	Promedio en 5 μL	Promedio para 1000 μL	FD (100)	Log	Red
0	6500	6500	6500	0	6500	1300000	130000000	8.11	0.00
2	6500	6500	6500	0	6500	1300000	130000000	8.11	0.00
4	6500	6500	6500	0	6500	1300000	130000000	8.11	0.00
6	6500	6500	6500	0	6500	1300000	130000000	8.11	0.00
8	44	48	42	3	45	8933	893333	5.95	2.16
10	30	28	26	2	28	5600	560000	5.75	2.37
12	20	19	16	2	18	3667	366667	5.56	2.55
24	7	7	5	1	6	1267	126667	5.10	3.01
26	9	10	8	1	9	1800	180000	5.26	2.86
30	10	13	11	2	11	2267	226667	5.36	2.76

Cuadro N° 18. Resultados del ensayo de cinética de muerte para *Salmonella enterica serovar Typhimurium* en combinación con Extracto Hidroalcohólico de Propóleos.

Tiempo	R 1	R 2	R 3	σ	Promedio en 5 μ L	Promedio para 1000 μ L	FD (100)	Log	Red
0	6500	6500	6500	0	6500	1300000	130000000	8.11	0.00
2	6500	6500	6500	0	6500	1300000	130000000	8.11	0.00
4	6500	6500	6500	0	6500	1300000	130000000	8.11	0.00
6	6500	6500	6500	0	6500	1300000	130000000	8.11	0.00
8	6500	6500	6500	0	6500	1300000	130000000	8.11	0.00
10	6500	6500	6500	0	6500	1300000	130000000	8.11	0.00
12	55	52	58	3	55	11000	1100000	6.04	2.07
24	30	32	36	3	33	6533	653333	5.82	2.30
26	15	12	14	2	14	2733	273333	5.44	2.68
30	5	12	10	4	9	1800	180000	5.26	2.86

Cuadro N° 19. Resultados del ensayo de cinética de muerte para *Salmonella enterica serovar Typhimurium* en combinación con la mezcla Ciprofloxacina y Extracto Hidroalcohólico de Propóleos.

Tiempo	R 1	R 2	R 3	σ	Promedio en 5 μ L	Promedio para 1000 μ L	FD (100)	Log	Red
0	6500	6500	6500	0	6500	1300000	130000000	8.11	0.00
2	6500	6500	6500	0	6500	1300000	130000000	8.11	0.00
4	6500	6500	6500	0	6500	1300000	130000000	8.11	0.00
6	6500	6500	6500	0	6500	1300000	130000000	8.11	0.00
8	6500	6500	6500	0	6500	1300000	130000000	8.11	0.00
10	34	38	36	2	36	7200	720000	5.86	2.26
12	32	28	30	2	30	6000	600000	5.78	2.34
16	10	8	8	1	9	1733	173333	5.24	2.88
18	6	7	5	1	6	1200	120000	5.08	3.03
20	8	12	10	2	10	2000	200000	5.30	2.81
22	18	22	21	2	20	4067	406667	5.61	2.50
24	18	16	26	5	20	4000	400000	5.60	2.51
26	17	19	19	1	18	3667	366667	5.56	2.55
30	18	20	24	3	21	4133	413333	5.62	2.50