

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE QUÍMICA Y FARMACIA



EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTI *Helicobacter pylori* DE
PROPOLEOS PROCEDENTES DE TRES LOCALIDADES DE EL
SALVADOR

TRABAJO DE GRADO EN MODALIDAD DE TRABAJO DE
INVESTIGACION

PRESENTADO POR

XIOMARA LISBETH ALFARO BARAHONA

ANA CATALINA REYES PEÑA

PARA OPTAR AL GRADO DE
LICENCIADA EN QUIMICA Y FARMACIA

OCTUBRE 2022

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

LICENCIADA REINA MARIBEL GALDAMEZ

SECRETARIO INTERINO

MAESTRO ROBERTO EDUARDO GARCIA ERAZO

DIRECCION DE PROCESOS DE GRADUACION

DIRECTORA GENERAL

MSc. Ena Edith Herrera Salazar

TRIBUNAL EVALUADOR

**ASESORA DE AREA EN APROVECHAMIENTO DE RECURSOS
NATURALES**

Licda. Ana Miriam Santamaría de Campos

ASESORA DE AREA EN MICROBIOLOGIA

Dra. Tania Ethel Cuadra Zelaya

DOCENTE ASESOR

MSc. Mario Herbert Romero Rivera

AGRADECIMIENTOS

De manera inmensa agradezco a Dios Todopoderoso por haberme brindado la fortaleza y la tenacidad para lograr este importante éxito en mi vida, a quien le debo la honra y la gloria por haberme además dotado de la sabiduría, el temple y la salud, para que llegado este momento pueda sentirme agradecida y bendecida aún por mi hermosa familia que me acompañó durante este lapso de preparación académica, que no fue fácil ya que se tuvo que atravesar duros momentos que hacían tambalear mi estado emocional, situación en la que demostró Dios que no podía dejarnos de su mano porque nos tenía preparado este triunfo, pero de igual forma la familia estaba allí demostrándome que soy muy importante entre ellos, y que igualmente celebran esta bendición con la misma satisfacción propia, entre ellos a mi madre Raquel Barahona Flores, que con sacrificio y entrega absoluta, no se doblegó hasta ver su sueño en mi culminado siendo así el motor importante y principal para este logro, a mis abuelos maternos Josefita Flores de grata recordación quien fue casi mi madre y apoyo invaluable inmenso, Eugenio Barahona Pino, quien desde mi niñez me motivó a que existiera el deseo en mi persona a ser una profesional, aún recuerdo cuantas veces se sintió orgulloso de mí cuando en mis juegos de niña y primeras letras advocaba el sentimiento sincero de verme crecer convertida en una profesional, llegando a ser mi ídolo y además mi ejemplo a seguir, aunque ahorita no pueda comprender mi felicidad y celebrarla conmigo, sé que estuviera muy feliz, constituyéndose así ambos en pilares esenciales durante el trayecto de mi desarrollo estudiantil, ya que de manera sincera e incondicional me brindaron todo el apoyo económico y moral.

También agradezco al MSc. Mario Herbert Romero quien al constituirse como asesor demostró confianza y paciencia, siendo de mucho apoyo, aportando además sus conocimientos para que se pudiera llevar a cabo con éxito este trabajo de investigación. A Catalina Reyes, sintiéndome dichosa de poder contar

los años que hemos sido amigas, compartiendo buenos y malos momentos en nuestra etapa universitaria haciendo engrandecer aún más nuestra amistad en este proceso como compañeras de tesis. A la Universidad de El Salvador, quien me abrió las puertas para que a través de la facultad de Química y Farmacia fuera posible mi triunfo profesional.

Xiomara Lisbeth Alfaro Barahona

DEDICATORIA

A Dios por brindarme la salud y la fortaleza para culminar mi meta con éxito, y por haberme también brindado la compañía y cariño de los seres más importantes en mi vida, que además constituyen mi fuente de inspiración y apoyo incondicional.

A mi madre Raquel Barahona Flores, quien confió y creyó en mí y en mis expectativas desde el primer día, quien estuvo apoyándome en todos los aspectos celebrando cada pequeño logro y animándome a seguir hacia la meta.

A mi abuelo, Eugenio Barahona Pino por siempre desear lo mejor para mi vida, con consejos y enseñanzas que me guiaron a lo largo de estos años, y que permanecerán como baluarte en mi peregrinar terrenal.

A mi compañera Catalina Reyes quien puso en mí su confianza para que además de ser amigas fuésemos compañeras en este proyecto, formando lazos de amistad y hermosos recuerdos, que serán imperecederos en mi mente.

Xiomara Lisbeth Alfaro Barahona

AGRADECIMIENTOS

Agradezco primero que todo a Dios, quien me llevo de su mano por todo el recorrido durante este proceso de formación académica y personal, siendo mi protector y guía en todo momento. Por ello para Dios es la gloria y honra de haber podido culminar con este objetivo de mi vida, pues me brindo la sabiduría, fe y tenacidad necesaria.

A mi Madre Rosa Mirna y mi padre José Ángel, porque siempre me apoyaron económicamente, a pesar de los días malos y duros de nuestras vidas y nunca desistieron en acompañarme por este camino; por ser el mejor ejemplo a seguir y por haberme impulsado a crecer y superarme. A los miembros que componen mi familia: Azucena, Oscar, Mélida, María, Virginia, Eduardo, Armando, que con su convivencia y hermandad nos hemos apoyado mutuamente en las dificultades que la vida nos ha puesto, también a mi abuela Catalina Rivas por ser mi apoyo y confidente en mis problemas y siempre querer lo mejor para mí. Gracias Familia.

Al docente Licenciado Guillermo Castillo, por brindarme su amistad incondicional, cuidarme y aconsejarme en todo momento sin esperar nada a cambio.

A mi compañera y amiga Xiomara Alfaro, que ha sido un apoyo emocional y me ha brindado su amistad, agradezco a Dios por permitirme compartir con ella tantas experiencias a lo largo de la carrera, y además darnos la valentía y la sabiduría de realizar juntas este trabajo y poder así seguir compartiendo de nuestros conocimientos y aptitudes.

A mi asesor Maestro Mario Herbert Romero Rivera por creer en mi capacidad, por su paciencia y apoyarme siempre de la mejor manera brindándome su conocimiento y experiencia para optimizar el desarrollo del trabajo de investigación.

Ana Catalina Reyes Peña

DEDICATORIA

A Dios; por ser mi Fortaleza para seguir adelante sin importar las dificultades, brindarme inteligencia y por guiar mi camino con bien y sabiduría.

A mi madre Rosa Mirna y mi padre José Ángel por todos los sacrificios hechos para sacarme adelante dándome su amor y apoyo incondicional y por enseñarme a ser una persona fuerte y resiliente para poder salir adelante en la vida. Muchísimas gracias.

A mi estimado docente asesor Maestro Mario Herbert Romero por brindarme su apoyo y confianza, gracias por compartir lo más valioso del ser humano; sus conocimientos y habilidades para poder realizar este trabajo.

A mi Compañera y Amiga Xiomara Alfaro, por soportarme y brindarme su amistad.

A mis amigos Krissia, Johana, Roger y mi primo Oscar y mi amiga Keisy, quienes han estado conmigo y han sido un gran apoyo y en momentos difíciles de mi vida han sido de mucha bendición para mí, gracias por su amistad y siempre brindarme palabras de ánimos reforzando la confianza en mis capacidades y no desfallecer hasta cumplir mi meta.

Son muchas las personas que han formado parte de mi vida a las que me encantaría dedicarles este trabajo por su amistad, consejos, apoyo, ánimo y compañía en los momentos más difíciles de mi vida. Gracias a todos.

Ana Catalina Reyes Peña

INDICE GENERAL

RESUMEN	
CAPITULO I	
1.0 INTRODUCCION	xx
CAPITULO II	
2.0. OBJETIVOS	23
2.1. Objetivo General	
2.2. Objetivos Específicos	
CAPITULO III	
3.0 MARCO TEORICO	25
3.1 Propóleo	25
3.2 Composición química	26
3.3 Flora y ubicación geográfica de los sitios de recolección	29
3.3.1 Municipio de Chilanga	29
3.3.2 Municipio de Huizúcar	30
3.3.3 Municipio de San Alejo	30
3.4 Disolventes para la preparación de los extractos de propóleo	31
3.5 Propiedades biológicas de los propóleos	32
3.6 Actividad antimicrobiana de los propóleos	32
3.7 <i>Helicobacter pylori</i>	34
3.7.1 Características microbiológicas	34
3.8 Prevalencia	35
3.9 Vías de transmisión	37

3.10 Efectos patológicos en el organismo humano	37
3.10.1 Inflamación crónica	38
3.10.2 Gastritis crónica	39
3.10.3 Dispepsia funcional	39
3.10.4 Úlcera péptica	40
3.10.5 Cáncer gástrico	40
3.10.6 Linfoma tipo MALT	41
3.11 Tratamientos erradicadores de <i>Helicobacter pylori</i>	42
3.11.1 Resistencia antibiótica	43
3.12 Métodos de sensibilidad antimicrobiana	44
3.12.1 Método de difusión en Agar	45
3.12.2 Concentración mínima inhibitoria por microdilución	45
3.12.3 Determinación de la actividad antimicrobiana utilizando la técnica de ajedrez.	47
3.12.3.1. Definición del punto final	49
3.12.3.2. Interpretación de los resultados	50
3.12.3.3. Cálculo del índice de concentración inhibitoria fraccional (FIC) para combinaciones de dos antimicrobianos	51
3.13 Cinética de muerte	52
CAPITULO IV	
4.0 DISEÑO METODOLOGICO	55
4.1. Tipo de estudio	55
4.2. Investigación bibliográfica	55

4.3. Investigación de campo	55
4.3.1. Ubicación y recolección de muestras del propóleo crudo	55
4.4. Parte experimental	56
4.4.1. Preparación de solución madre y diluciones de los extractos de los propóleos	56
4.4.2. Preparación de cultivo de trabajo	56
4.4.3. Procedimiento para el método de difusión en agar	57
4.4.4. Concentración mínima inhibitoria	57
4.4.5. Determinación del efecto antibiótico mediante el método de Tablero de Ajedrez	59
4.4.6. Cinética de muerte	59
CAPITULO V	
5.0 CUMPLIMIENTO DE OBJETIVOS	62
5.1 Preparación de cultivo de trabajo	62
5.2 Resultados de la evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos hidroalcohólicos de propóleos frente a <i>Helicobacter pylori</i> NCTC 11637 por los métodos de sensibilidad antimicrobiana: difusión en agar, concentración mínima inhibitoria	63
5.3 Evaluación de la actividad antibiótica del extracto hidroalcohólico de propóleo frente a <i>Helicobacter pylori</i> NCTC 11637, utilizando la técnica de Tablero de ajedrez	70
5.4 Resultados de la evaluación de cinética de muerte de <i>Helicobacter pylori</i> NCTC 11637	73
CAPITULO VI	

6.0 CONCLUSIONES	80
CAPITULO VII	69
7.0 RECOMENDACIONES	83
BIBLIOGRAFIA	85
ANEXOS	92

INDICE DE FIGURAS

Figura N°		Pág. N°
1	Técnica del tablero de ajedrez.	47
2	Evaluación de la interacción de antimicrobianos mediante el método del tablero de ajedrez.	48
3	Fórmula para determinar el índice fraccional inhibitorio.	51
4	Disposición de gotas de caldo de cultivo en una placa de agar para contar las unidades formadoras de colonias por mililitro.	53
5	Cultivo de <i>Helicobacter pylori</i> NCTC 11637 en agar columbia suplementado con sangre de carnero desfibrinada al 8% y suplemento Dent al 1%.	63
6	Resultados de la tinción de Gram. Bacilos largos Gramnegativos curvados.	64
7	Resultados del método de difusión en agar. Extracto hidroalcohólico de propóleo perteneciente a Chilanga, Morazán.	65
8	Ensayo de concentración mínima inhibitoria del extracto de propóleo de Chilanga frente a <i>Helicobacter pylori</i> .	69
9	Ensayo de concentración mínima inhibitoria de antibiótico claritromicina frente a <i>Helicobacter pylori</i> .	69
10	Efecto antibiótico usando la técnica de tablero de ajedrez. Mezcla de EHP y claritromicina frente a <i>Helicobacter pylori</i> .	72
11	Determinación de la muerte bacteriana de la cepa de H. pylori NCTC 11637 frente al extracto hidroalcohólico de propóleo de la región de Chilanga, Morazán.	75
12	Separación de metabolitos de los extractos de los propóleos utilizando técnicas cromatográficas.	92

13	Espectros obtenidos mediante técnicas RMN, IR y UV de los compuestos mayoritarios y estructura de Kukulkanin A.	93
14	Lugares de recolección de muestras de los propóleos.	94
15	Muestra de extracto hidroalcohólico de propóleo procedente de la zona geográfica de San Alejo, La Unión.	97
16	Muestra de extracto hidroalcohólico de propóleo procedente de la zona geográfica de Huizúcar, La Libertad	97
17	Muestra de extracto hidroalcohólico de propóleo procedente de la zona geográfica de Chilanga, Morazán.	98
18	Esquema de preparación de diluciones del extracto hidroalcohólico de propóleo.	103
19	Procedimiento para el cultivo de la cepa de <i>Helicobacter pylori</i> NCTC 11637.	104
20	Procedimiento para el método de difusión en Agar.	105
21	Procedimiento para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI).	106
22	Procedimiento para la determinación del efecto antibiótico mediante el método de tablero de ajedrez.	107
23	Procedimiento para la determinación de cinética de muerte.	108

INDICE DE TABLAS

Tabla N°		Pág. N°
1	Grupos de metabolitos secundarios encontrados en propóleos.	27
2	Principales componentes antimicrobianos del propóleo.	32
3	Resultados obtenidos de cinética de muerte de <i>Helicobacter pylori</i> .	74

INDICE DE ANEXOS

Anexo N°

- 1 Separación de compuestos mayoritarios presentes en propóleos procedentes de Chilanga, departamento de Morazán, realizado por la Facultad de Química y Farmacia.
- 2 Espectros obtenidos de los propóleos procedentes de Chilanga, departamento de Morazán, realizados por la Facultad de Química y Farmacia.
- 3 Mapa de El Salvador y lugares de recolección de las muestras de propóleo.
- 4 Recolección y condiciones de almacenamiento de las muestras de propóleos.
- 5 Fotografías de las muestras de propóleo, según zona de procedencia.
- 6 Lista de materiales, equipo, reactivos y medios de cultivo.
- 7 Esquemas para la realización de los ensayos: preparación de las diluciones de los EHP, cultivo de la cepa de *Helicobacter pylori* NCTC 11637. difusión en agar, concentración mínima inhibitoria, tablero de ajedrez y cinética de muerte.
- 8 Cálculo del índice fraccional inhibitorio (FIC).

ABREVIATURAS

μL:	Microlitros
μm:	Micrómetro
μM	Micromolar
BHI:	Caldo infusión cerebro corazón
°C:	Grados Celsius
CMI:	Concentración Mínima Inhibitoria
CMB	Concentración Mínima Bactericida
EHP:	Extracto Hidroalcohólico de Propóleo
DMSO:	Dimetilsulfóxido
FIC:	Concentración bactericida fraccional
g:	Gramos
IARC:	Agencia Internacional del Cáncer
IBP:	Inhibidor de bomba de protones
IR:	Infrarrojo
L:	Litros
MALT:	Tejido linfoide asociado a mucosas
mL:	Mililitros
mm:	Milímetros
NCTC:	National Colletion of Type Cultures
nm:	Nanómetro
OMS:	Organización Mundial de la Salud
RMN:	Resonancia Magnética Nuclear
TLC:	Cromatografía de capa fina
UFC:	Unidades Formadoras de Colonias
UV/VIS	Ultravioleta-visible

RESUMEN

El microorganismo *Helicobacter pylori*, es un microorganismo incluido dentro de los 16 microorganismos más peligrosos del mundo según la Organización Mundial de la Salud (OMS), además de ser catalogado por la Agencia Internacional para Investigación en Cáncer (IARC) como carcinógeno del grupo 1. Se han realizado diversos estudios sobre los beneficios que tienen los productos naturales como alternativa para tratar diferentes patologías, entre ellos está el propóleo, el cual ha sido muy estudiado en los últimos años por sus diversas actividades biológicas como: antibacteriano, antioxidante, inmunomodulador, antiinflamatorio y anticancerígeno, entre otras, las cuales pueden variar de acuerdo a la composición química y la zona geográfica de donde se lleve a cabo su recolección.

En este estudio se determinó la actividad anti *H. pylori* NCTC 11637 de tres extractos hidroalcohólicos de propóleo, previamente liofilizados. Se realizó el ensayo *in vitro* de difusión en agar, y solamente el extracto hidroalcohólico de propóleo procedente de Chilanga, Morazán presentó actividad inhibitoria; consecutivamente se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI). También se estableció la forma de interacción entre el propóleo con actividad antibiótica y la claritromicina, mediante la técnica de tablero de ajedrez. Se obtuvo como resultado un efecto de indiferencia, ya que no se observó sinergismo o mejora de la actividad antimicrobiana de la mezcla de antibióticos. Luego se determinó cinética de muerte por la técnica de microgota, para estudiar el tiempo en que la mezcla de extracto hidroalcohólico de propóleo y claritromicina causaban muerte microbiana, y se comprobó que la cepa de *H. pylori* NCTC 11637 presentó muerte microbiana con dicha mezcla.

Por lo tanto, se comprobó que el extracto hidroalcohólico de propóleo perteneciente al municipio de Chilanga, departamento de Morazán, posee actividad antimicrobiana frente a *Helicobacter pylori* NCTC 11637 y que la misma presenta susceptibilidad en presencia de claritromicina.

Para llevar a cabo dichos ensayos, se utilizaron las muestras de extractos hidroalcohólicos de propóleo procedentes de: Huizúcar del departamento de La Libertad; Cantón las joyas del Municipio de Chilanga del departamento de Morazán y San Alejo, en el departamento de La Unión, utilizando las concentraciones de 20,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 15,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 10,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 5,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Las localidades fueron seleccionadas, debido a que poseen estudios previos realizados en la Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador, que evidencian la actividad antimicrobiana contra algunas bacterias Gram negativas, y perfiles cromatográficos que determinan una interesante composición química. Esta investigación se realizó en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador, durante el periodo de octubre del año 2021 a febrero del año 2022.

CAPITULO I
INTRODUCCION

1.0 INTRODUCCION

Durante mucho tiempo, los seres humanos se han favorecido de los productos naturales para curarse de las enfermedades que les han aquejado. El propóleo es un producto resinoso y complejo, con una variable apariencia física, el cual es recogido y transformado por las abejas melíferas, y ahora en día por sus propiedades actividades hepatoprotectoras, antitumorales, inmunomoduladoras, regenerativas, cicatrizantes, anestésicas, antioxidantes y antimicrobianas se considera una alternativa para tratamientos fitoterápicos. Es por esa razón que en los últimos años se han realizado algunas investigaciones acerca de la composición y actividad biológica, obteniendo resultados prometedores para considerar una fuente fiable para la obtención de nuevos fármacos, tal es el caso de los agentes antimicrobianos; sin embargo, todavía no se tiene una seguridad para usarlo en tratamientos. El *Helicobacter pylori* es una bacteria que ya posee resistencia a muchos antibióticos, además, ha sido catalogada como una bacteria carcinógena humano tipo 1, por lo que existen estudios internacionales que buscan demostrar la efectividad del propóleo sobre esta bacteria, y se considera necesario, darle continuidad en nuestro país para identificar nuevos productos que actúen contra ella.

La presente investigación se llevó a cabo con el propósito de estudiar la actividad anti-*Helicobacter pylori* de propóleos procedentes de tres localidades de El Salvador, siendo ellas: San Alejo, en el departamento de La Unión, Huizúcar, en el departamento de La Libertad y Chilanga, del departamento de Morazán. Estos municipios cuentan con una flora muy variada, por lo cual, ha sido un tema de mucha importancia que ha dado surgimiento a nuevas investigaciones realizadas en El Salvador para determinar la composición química y actividad antimicrobiana del propóleo según la zona geográfica del país.

Investigaciones salvadoreñas reportan que en la composición química del propóleo salvadoreño se encuentran diversos metabolitos secundarios, entre los

cuales se pueden mencionar: triterpenos, diterpenos, flavonoides y chalconas, las cuales han mostrado determinar la actividad antimicrobiana contra bacterias Gram negativas. Mostrando así resultados prometedores para esta investigación exploratoria y experimental que se realizó para determinar la actividad antimicrobiana contra una bacteria Gram negativa, microaerófilo.

En el estudio realizado mediante el ensayo de difusión en agar se evidenció la actividad anti-*Helicobacter pylori* que posee el extracto hidroalcohólico de propóleo perteneciente a la zona geográfica de Chilanga, Morazán, ya que se obtuvo zona de inhibición de 12mm al poner a prueba la concentración de 20,000 µg/mL, y a la vez se obtuvo la concentración mínima inhibitoria (CMI) de 23,810 µg/mL, por la cual se reporta una actividad antimicrobiana débil. En el estudio de la cinética de muerte por el método de microgota se logró obtener una reducción logarítmica del crecimiento microbiano al poner a prueba una mezcla de extracto hidroalcohólico de propóleo y el antibiótico Claritromicina evidenciando muerte microbiana de *H. pylori* al transcurrir 2 horas. Además, se determinó el tipo de interacción por medio de la técnica de tablero de ajedrez utilizando Claritromicina en combinación con el extracto hidroalcohólico de propóleo a las concentraciones de 30 µg/mL y 2,834.5 µg/mL respectivamente, y se obtuvo un índice de FIC de 1.99, teniendo como resultado un efecto de indiferencia al realizar la mezcla de antibiótico a las concentraciones ensayadas.

Las muestras que se utilizaron fueron recolectadas en el período de mayo a julio del año 2019 que generalmente es época lluviosa y fueron los apicultores de cada zona en estudio quienes las recolectaron mediante el método de raspado, estas muestras se guardaron en estado liofilizado en condiciones de temperatura entre los de 4°C a 8°C.

Los ensayos microbiológicos se realizaron en el Laboratorio de microbiología de la Facultad de Química y Farmacia, de la Universidad de El Salvador, durante el período de octubre del año 2021 a febrero del año 2022.

CAPITULO II
OBJETIVOS

2.0 OBJETIVOS

2.1. Objetivo General:

Determinar la actividad anti *Helicobacter pylori* de propóleos procedentes de tres localidades de El Salvador.

2.2. Objetivos Específicos:

- 2.2.1 Identificar la actividad anti *Helicobacter pylori* NCTC 11637 de tres extractos hidroalcohólicos de propóleos, por los métodos de sensibilidad antimicrobiana: difusión en agar, concentración mínima inhibitoria.
- 2.2.2 Conocer el efecto antibiótico de los extractos hidroalcohólicos de propóleos en combinación con el antibiótico claritromicina, utilizando el método de tablero de ajedrez.
- 2.2.3 Establecer la cinética de muerte del microorganismo en estudio mediante la interacción de extractos hidroalcohólicos de propóleos en combinación de un antibiótico.

CAPITULO III
MARCO TEORICO

3.0 MARCO TEORICO

3.1 Propóleo

Es un producto apícola resinoso complejo, posee un aspecto físico que varía mucho, dependiendo de muchos factores. El color puede ser crema, amarillo verdoso, marrón verdoso, marrón oscuro, verde oscuro, castaño, rojizo e incluso negro. Algunas muestras tienen una textura dura y friable, mientras que otras pueden ser elásticas y gomosas. Su aroma puede ser placentero a yemas de especies arbóreas, miel, ceras y vainilla, pero también puede tener sabor amargo. El nombre de propóleo proviene del griego *propolis*, *pro* “en defensa de” y *polis* “ciudad”; es decir, en defensa de la ciudad. Por lo tanto, implica un producto que participa en la defensa de la colmena. ^{(1) (2)}

El mecanismo de recolección del propóleo y de su descarga en la colmena muestra la organización y disciplina de esta. El proceso comienza en el momento en que la abeja (*Apis mellifera*) reconoce la resina vegetal ideal (la que tiene actividad biológica) de las plantas, luego valiéndose con ayuda de su primer par de patas trata de desprenderla; y posteriormente la abeja utiliza la secreción de sus glándulas mandibulares la cual contiene ácido 10-hidroxi-2-decenoico, para lograr el ablandamiento. Al triturar, con una de las patas transfiere a la cestilla de la pata posterior, cuando la llenan la transportan a la colmena. ^{(3) (4)}

Las abejas realizan las operaciones de recolección en general en días calurosos con temperaturas superiores a 20 °C y entre las 10 a 15 horas aproximadamente, esto se debe a la maleabilidad del producto, ya que se endurece a los 15 °C y se torna maleable a medida que la temperatura aumenta, siendo su punto de fusión entre los 60-70 °C. Al ingresar a la colmena, las abejas se dirigen inmediatamente al lugar donde el propóleo es requerido y permanecen quietas, permitiendo a las abejas propolizadoras, tomar algunas partículas de la sustancia para comprimir y agregar cera para su posterior propolizado. ⁽²⁾

Este producto apícola es utilizado en la colmena con fines múltiples, para cerrar grietas, e impedir la entrada de otros insectos, además de barnizar la colmena con fines desinfectantes protegiéndola contra bacterias hongos y virus. ⁽³⁾

Diversos estudios demuestran que el propóleo posee propiedades antioxidantes, antimicrobianas y antifúngicas, entre otras, las cuales dependen de su origen botánico, composición química, estación climática, método de extracción, edad y zona geográfica de recolección. En algunos estudios se ha demostrado el efecto de los extractos de propóleos sobre ciertas bacterias y hongos, así como patógenos de interés alimentario, además de la capacidad que tienen para prevenir o retardar reacciones de oxidación. ⁽⁵⁾

3.2 Composición química

El propóleo por ser un producto natural recibe la denominación GRAS (Generalmente reconocido como seguro). La composición del propóleo es muy compleja y de manera general contiene la presencia de cera, mezclada en proporciones de entre 20-30%. Ciertas muestras obtenidas por raspado presentan cantidades de cera entre el 25-35%, de resinas y bálsamos aromáticos constituye el 40-55%, de aceites esenciales es entre el 5-10%, el polen representa entre el 4-5% del peso de una muestra y por último las sustancias orgánicas y minerales constituyen un 5%. ⁽²⁾

Sin embargo, la composición química de este producto apícola es altamente variable, pues se encuentra comúnmente ligada al origen botánico y geográfico de la zona de recolección, debido a que la flora contribuye a muchas de sus propiedades físicas como el color, sabor, textura y punto de fusión; por la misma razón, la estación del año es otro factor que influye en su calidad. Hasta 2018, en propóleos de diferentes zonas geográficas del mundo se han identificado más de 300 principales componentes, entre los que se pueden mencionar compuestos fenólicos tales como flavonoides y derivados del ácido cinámico, ácidos fenólicos y ésteres de ácidos fenólicos, aldehídos, cetonas, alcoholes, quinonas,

sesquiterpenos, ésteres, cumarinas, aminoácidos y compuestos inorgánicos (ver tabla N° 1).⁽⁶⁾

Por lo tanto, aunque el propóleo es obviamente un producto animal, una proporción considerable de sus componentes, principalmente aquellos sobre los que descansa su actividad biológica, son de origen vegetal. La resina contiene la mayoría de los compuestos que se encuentran en los extractos alcohólicos consumidos por personas de muchos países como complementos alimenticios o medicina alternativa.⁽¹⁾

Tabla N° 1. Grupos de metabolitos secundarios encontrados en propóleos.^{(7) (8)}

Ácidos orgánicos	Ácido benzoico, ácido gálico.
Ácidos fenólicos	Ácido caféico, ácido ferúlico, ácido cinámico, ácido fenílico, ácido isofenílico, ácido cumarínico.
Aldehídos aromáticos	Vainillina, Isovainillina.
Cumarinas	Esculetol, escopoletol.
Flavonas	Acacetina, crisina, pectolinarigenina, tectocrisina, apigenina.
Flavonoles	Galangina, izalquinina, kaempferol, quercetina, ramnocitrina.
Flavanonas	Pinocembrina, sakuranetina, naringenina.
Dihidroflavononas	Pinobanksina.
Terpenoides	Limoneno, cimeno y estireno.
Diterpenos	Totarol, ácido isocuprésico, ácido imbricatólico, manool.
Triterpenos	α - amirina, β - amirina, Lupeol, Lupenona.

En el año 2020 se realizó un estudio, sobre las características fisicoquímicas y los perfiles cromatográficos por capa fina (TLC) de propóleos procedentes de cinco localidades de El Salvador: municipio de Huizúcar, La Libertad, municipio de Juayúa, Sonsonate y los municipios Chilanga, El Rosario, Jocoaitique del departamento Morazán. En el perfil cromatográfico, lograron identificar en todas las muestras de propóleos: triterpenos de la serie del ursano y oleano tipo alfa y beta amirina respectivamente. Estos triterpenos se encuentran distribuidos en gran número de especies vegetales y son los responsables de darle la consistencia de laca resinosa y sabor amargo a los propóleos. Asimismo, los

propóleos muestreados presentaron características organolépticas y fisicoquímicas muy variables. ⁽⁸⁾

En dichas muestras de propóleo, se encontró la presencia de chalconas que pertenecen a los flavonoides, específicamente *trans* chalconas (kukulkanin A). Este metabolito se encontró presente únicamente en los propóleos de la zona norte del departamento de Morazán (El Rosario y Chilanga). Estudios previos demuestran que la kukulkanin A, ha podido ser aislada e identificada en especies del género fabáceas, como el “conacaste” (*Enterolobium cyclocarpum*) y tepezcohuite (*Mimosa tenuiflora*). Por otra parte, la presencia de compuestos relacionados de tipo flavona, flavanona y flavonoles, fueron evidentes en los propóleos de la zona de bosques caducifolios de la zona norte del departamento de Morazán; y la identificación del ácido isocuprésico en el sitio de Juayúa, que se correlaciona con su flora propia de bosques de coníferas. Otro tipo de flavonoide encontrado en la muestra de propóleo de Chilanga, Morazán fue la quercetina, del tipo flavonol. Este metabolito se encuentra en árboles frutales como el “marañón” (*Anacardium occidentale*) y el mango (*Mangifera indica*). ⁽⁸⁾

A la misma vez, determinaron el porcentaje de resina para cada una de las muestras de propóleo. Los propóleos que presentaron mayor contenido de resina fueron: Chilanga ($50.45 \pm 2.01\%$) colectado por el método de malla y Huizúcar ($30.30 \pm 0.82\%$) colectado por el método de raspado. El resto de las muestras de propóleo presentaron un contenido de resinas menor al valor mínimo exigido por la Normativa salvadoreña (NSO 65.19.02:03). ⁽⁸⁾

El parámetro que influye notablemente en la calidad del propóleo es el contenido de resinas solubles en etanol. Cuanto mayor sea el valor de esta fracción, superior será en términos de rendimiento, la calidad del producto final, puesto que es allí donde se encuentran los compuestos con actividad biológica, tales como: los polifenoles, flavonoides, chalconas y los terpenos polares. ⁽⁹⁾

3.3 Flora y ubicación geográfica de los sitios de recolección

La composición química del propóleo depende de la flora en el área donde es recolectado, esta composición también depende de fenómenos locales, vinculados con la temperatura, las precipitaciones, el tipo de suelo, la humedad relativa, insolación y la evapotranspiración. ⁽²⁾

El Salvador es un país ubicado en América Central, se encuentra organizado en 14 departamentos, que a su vez se dividen en 262 municipios. ⁽¹⁰⁾

3.3.1 Municipio Chilanga

Chilanga es un municipio del departamento de Morazán en El Salvador. Limita al norte con Gualococti, Osicala, Delicias de Concepción y Yoloaiquín; al este con Lolotiquillo y San Francisco Gotera; al sur con Sensembra, Yamabal; al oeste con San Simón. Para su administración Chilanga se encuentra dividido en 5 cantones y 47 caseríos. Siendo sus cantones: Chaparral, Joya del Matazano, Lajitas, Pedernal, Piedra Parada. ⁽¹⁰⁾

La flora constituye bosque húmedo tropical, bosque húmedo subtropical. Las especies arbóreas más notables son: “conacaste” (*Enterolobium cyclocarpum*) “morro” (*Crescentia alata* Kunth), “cedro” (*Cedrela salvadorensis* Standl), “nance” (*Byrsonima crassifolia*), “mango” (*Mangifera indica*), “marañón” (*Anacardium occidentale*) y “mangollano” (*Pithecellobium dulce*), “Carreto” (*Pithecellobium saman* Jacq.). ⁽⁸⁾

Los propóleos de la zona de Chilanga presentan una coloración verdosa y amarillenta, lo cual podrían estar relacionado con especies propias de bosques caducifolios de la zona como el “laurel” (*Cordia alliodora*) y “tepezcohuite” (*Mimosa tenuiflora*). ⁽⁸⁾

3.3.2 Municipio Huizúcar

Huizúcar es un municipio del departamento de La Libertad en El Salvador. Limita al norte con Nuevo Cuscatlán, Antiguo Cuscatlán y San Marcos, al sur con La Libertad, al este con Panchimalco y Rosario de Mora y al oeste con San José Villanueva. Para su administración Huizúcar se encuentra dividido en 6 cantones y 32 caseríos. Siendo sus cantones: Analquito, La Lima, Nazareth, Ojos de Agua, San Juan Buenavista, Tilapa. ⁽¹¹⁾

A nivel de flora cuenta con amplia vegetación, que es de tipo bosque húmedo subtropical, encontrándose arboles como “pino ocote” (*Pinus oocarpa*), “chaparro” (*Curatella americana*), “nance” (*Byrsonima crassifolia*), “roble” (*Quercus corrugata*), “pepeto” (*Inga vera*) y “café” (*Coffea arabiga* L). ⁽¹²⁾

3.3.3 Municipio de San Alejo

San Alejo es un municipio del departamento de La Unión en El Salvador. Limita al norte con Yucuaiquín, Bolívar, San José y Pasaquina; al este con Pasaquina y La Bahía de La Unión; al sur con La Unión y El Carmen; al oeste con Yayantique. Para su administración San Alejo se encuentra dividido en 17 cantones y 43 caseríos. Siendo sus cantones: Agua Fría, Bobadilla, Ceibitas, Cerco de Piedra, Copalío, El Caragon, El Tamarindo, El Tizatillo, Hato Nuevo, Las Queseras, Los Jotes, Mogotillo, San Jerónimo, San José, Santa Cruz, Tempisque, Terreno Blanco. ⁽¹³⁾

La flora está constituida por bosque seco tropical, transición a subtropical. Las especies arbóreas más notables son: “morro” (*Crescentia alata* Kunth), “chaparro” (*Curatella americana*), “nance” (*Byrsonima crassifolia*), “roble” (*Quercus* sp.), “pepeto” (*Inga* sp.), “madrecacao” (*Gliricidia sepium*), “guarumo” (*Cecropia peltata*), “carbón negro” (*Piptadenia oblicua*), “carbón blanco” (*Acacia farnesiana*), “laurel” (*Cordia alliodora*), “quebracho” (*Lysiloma divaricatum*),

“almendro de río” (*Andira inermis*), “pintadillo” (*Prosopis juliflora*), “guacuco” (*Eugenia salamensis*), “copinol” (*Hymenaea courbaril*), y “jiote” (*Bursera simaruba*).^{(14) (15) (16) (17)}

San Alejo es uno de los tres municipios del departamento de La Unión, en donde se encuentran las siete especies de árboles de mangle que a la fecha han sido identificadas para El Salvador: “mangle colorado” (*Rhizophora mangle*), “mangle rojo” (*Rhizophora racemosa*), “mangle rojo gigante” (*Rhizophora harrisonii*; una especie particularmente poco común en el país), *Avicennia germinans* y *A. bicolor* (ambas especies conocidas como “madresal”), “botoncillo” (*Conocarpus erectus*), e “istatén” (*Laguncularia racemosa*). Mientras que en las zonas pantanosas dominan el “tule” (*Typha dominguensis*) y las ciperáceas, como las de géneros *Cyperus*, *Carex* y *Scleria*.⁽¹⁵⁾

3.4 Disolventes para la preparación de los extractos de propóleo

Los disolventes más utilizados para la extracción comercial y para el análisis químico son el etanol, propilenglicol, aceite y agua. Muchos de los componentes antioxidantes y antibacterianos presentes en el propóleo son solubles en agua o alcohol, por lo que este tipo de disolventes son ampliamente utilizados al momento de preparar extractos de propóleo con fines comerciales y de investigación, lo cual genera diferencias en la composición y actividad del extracto de propóleo obtenido.⁽⁵⁾

Se ha descubierto que los extractos etanólicos de los propóleos son eficaces contra una amplia gama de bacterias, especialmente contra especies de bacterias Gram positivas. La técnica más popular para la producción de extractos de propóleo es la acción hidroalcohólica. Este método es adecuado para obtener extractos de propóleo bajos en cera y ricos en compuestos biológicamente activos.⁽¹⁸⁾

3.5 Propiedades biológicas de los propóleos

Con el posterior desarrollo de la farmacéutica y tratamientos fitoterápicos existe un resurgimiento en su uso. Es por esa razón que en los últimos años se han realizado algunas investigaciones acerca de los productos provenientes de las abejas y sus potenciales beneficios para la salud humana. ⁽¹⁹⁾

Los estudios confirman que los propóleos tienen un buen potencial terapéutico, ya que se han revelado varias actividades biológicas, entre las cuales se incluyen: actividades hepatoprotectoras, antitumorales, inmunomodulatorias, regenerativas, cicatrizantes, anestésicas, antioxidantes y antimicrobianas. ⁽²⁰⁾

3.6 Actividad antimicrobiana de los propóleos

Dicha actividad se encuentra relacionada con la presencia de compuestos flavonoides, ácidos fenólicos y sus ésteres (ver tabla N° 2), evidenciada *in vitro* frente a varios tipos de bacterias Gram positivas y negativas, y también frente a hongos filamentosos y levaduras. ⁽²⁰⁾

Tabla N°2. Principales componentes antimicrobianos del propóleo. ⁽²⁾

Ácido caféico	(E)-3-(3,4-dihidroxifenil)-ácido-2-propenoico
Ácido p-cumárico	(E)-3-(4-hidroxifenil)-ácido-2-propenoico
Crisina	5,7-dihidroxi-2-fenilcroman-4-uno
Éster fenilico del ácido caféico (CAPE)	(E)-3-(3,4-hidroxifenil)-ácido-2-propenoico, 2-éster fenil
Galangina	3,5,7-trihidroxi-2-fenilcroman-4-uno
Naringenina	(2S)-5,7-dihidroxi-2-(4-hidroxifenil)-2,3-dihidrocroman-4-uno
Pinobanksina	(2R,3R)-3,5,7-trihidroxi-2-fenil-2,3-dihidrocroman-4-uno
Pinobanksina-3-acetato	[(2R,3R)-5,7-dihidroxi-4-oxo-2-fenil-2,3-dihidrocroman-3-yl] acetato
Pinocembrina	(2S)-5,7-dihidroxi-2-fenil-2,3-dihidrocroman-4-uno
Quercetina	2-(3,4-dihidroxifenil)-3,5,7-trihidroxicroman-4-uno

La actividad antibacteriana varía entre muestras recolectadas de distintas regiones geográficas; por ejemplo, de los propóleos europeos se debe a sus contenidos en agliconas flavónicas (galangina y pinocebrina) y compuestos fenólicos (pinobanksina, acetato de 3-O-pinobanksina, bencil-p-cumarato, ésteres del ácido cafeico y ácidos ferúlico y cafeico), en el de las Islas Canarias, se debe a la presencia de lignanos y furofuranos. ⁽¹⁹⁾

El propóleo alemán, rico en feniletil-trans-cafeato, bencil ferulato y galangina, es más activo, frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, que el francés, rico en bencil cafeato y pinocebrina y el mediterráneo (Bulgaria, Turquía, Grecia y Argelia); además está compuesto por flavonoides, ésteres de ácido cafeico y ácidos ferúlicos, diterpénicos e hidroxiditerpénicos, también muestra propiedades bacteriostáticas y bactericidas significativas. ⁽¹⁹⁾

El propóleo egipcio presenta una actividad antimicrobiana particular dependiendo de la región del país donde se produce, el proveniente de la región sur es más efectivo contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, siendo el de mayor efecto el proveniente de la ciudad de Banisweif, el cual tuvo un efecto moderado, mientras que el de Fayoum tuvo un efecto bajo. En la región cercana al delta, el material proveniente de Dakahlia y El-Saff presentó mayor actividad frente a *Escherichia coli* y el proveniente de Sharkia e Ismailia frente a *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*. ⁽¹⁹⁾

El propóleo brasileño se caracteriza por presentar compuestos fenólicos, entre los que destaca el ácido 3,5-diprenil-p-cumárico- que posee actividad antibacteriana significativa y sin diferencias estacionales frente a *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus faecalis* los propóleos producidos por *A. mellifera* colectado en Grecia contiene los diterpenos totarol y totarolona, que presentan actividad contra *Staphylococcus aureus*, *S.*

epidermidis, *Pseudomona aeruginosa* y *Escherichia coli*; en colectas de indonesia, se reportó a la propolina como metabolito contra *S. aureus*.⁽¹⁹⁾

En nuestro país, se han reportado estudios previos de propóleos salvadoreños de las localidades de San Alejo, La Unión y Huizúcar, La Libertad en donde los ensayos realizados a concentraciones muy altas mostraron actividad antimicrobiana frente a *Bacillus subtilis* y *Salmonella entérica serovar typhimurium* respectivamente. Estas muestras de propóleos salvadoreños presentaron flavonoides en su composición, siendo este tipo de metabolitos fundamentalmente responsables de la actividad antimicrobiana.

También el propóleo recolectado en Chilanga, Morazán ya ha sido estudiado anteriormente, mostrando actividad inhibitoria frente a *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella enterica serovar Typhimurium*, también se tiene algunos resultados previos de una investigación realizada en la Universidad de El Salvador sobre la composición química del propóleo de esta región obtenidos haciendo uso de métodos cromatográficos y elucidados por medio de estudios de resonancia magnética nuclear 1D y 2D (Ver anexo N°1 Y Anexo N°2).⁽²¹⁾

3.7 *Helicobacter pylori*

3.7.1 Características microbiológicas

Es un bacilo curvado y microaerófilo que mide de 2.0 a 4.0 μm de longitud y de 0.5 a 1.0 μm de ancho, con 1 a 3 espirales. Presenta de 5 a 7 flagelos enfundados, unipolares, de aproximadamente 3.0 μm de longitud protegidos de la degradación debido al medio ácido por una vaina de estructura lipídica. Microscópicamente es un bacilo Gram negativo, que presenta forma curva o de S, macroscópicamente en agar Columbia suplementado con sangre y antibióticos, las colonias se observan puntiformes, brillantes y transparentes o con un leve color grisáceo.⁽²²⁾

Para el cultivo, las muestras se obtienen a partir de mucosas gástricas y muestras extragástricas tomadas de placa dental, recto, vejiga y esófago; las condiciones de incubación en anaerobiosis son obligatorias si se tiene en cuenta que es un microorganismo muy exigente, observándose colonias entre 2 a 7 días en condiciones de: 5-10% O₂; 5-10 % CO₂; 80-90% N₂, humedad de 95% y temperatura de 35 a 37 °C. Usualmente se cultiva en medios complejos con sangre, suero y antibióticos. ⁽²³⁾

Al sembrar muestras de antro pilórico y fondo gástrico en agar Columbia adicionado con 7% de sangre desfibrinada de cordero y suplemento selectivo DENT (vancomicina, trimetoprim, anfotericina B y cefsulodin) se obtiene una alta especificidad (100%) siendo considerado el cultivo bacteriológico como prueba de oro. ⁽²³⁾

De acuerdo con su hábitat, se sabe que el epitelio gástrico humano es el único nicho ecológico del microorganismo, por ello se ha estimado que la bacteria no es exclusivamente un patógeno, sino más bien un agente anfibiótico, es decir, puede vivir en mutualismo con algunos huéspedes, mientras que en otros es capaz de desarrollar enfermedad bajo ciertas condiciones, como con los productos de los genes *vacA*, *cagA*, *babA* y *sabA*. ⁽²⁴⁾

3.8 Prevalencia

La prevalencia general del *H. pylori* es alta en los países en desarrollo y más baja en los países desarrollados; puede haber una variación amplia de la prevalencia entre las poblaciones urbanas de mayor nivel económico y las poblaciones rurales. ⁽²⁵⁾

Se estima que el 60% de la humanidad está infectada por *H. pylori*. Las áreas más afectadas son África (79,1%), América Latina y el Caribe (63,4%) y Asia (54,7%) y las menos afectadas Norte América (37,1%) y Oceanía (24,1%). ⁽²⁶⁾

En nuestro país se cuenta con datos de investigaciones de tesis doctorales las cuales reflejan una prevalencia promedio de seropositividad a *H. pylori* de 66.1%, aunque no se cuenta con estudios a gran escala que respalden dicha aseveración. (27)

La infección por *H. pylori* se encuentra ligada a factores como: la edad, etnia, género, geografía y condición socioeconómica, los cuales influyen en la incidencia y prevalencia de dicha infección, asimismo la educación y el nivel de ingresos que determina la amplia variación en la prevalencia de esta infección entre países. El bajo nivel socioeconómico, práctica de higiene personal pobre, sistema de eliminación de residuos pobre, las condiciones de hacinamiento y falta de agua limpia y segura se conocen como factores que hacen a los individuos más susceptibles para la infección. (25)

En todos los infectados produce gastritis crónica, sin embargo, en la mayoría de los pacientes es asintomática y en menos de 20% se produce una entidad clínica: úlceras pépticas en 15-18%, cáncer gástrico en 2-3%, y linfoma MALT gástrico en menos de 0,1%. Las consecuencias finales de la infección dependen de factores genéticos del individuo infectado, de la virulencia de la bacteria y de factores ambientales. Estudios epidemiológicos han estimado que *H. pylori* causa por lo menos 75% de los cánceres gástricos. Este microorganismo también está causalmente relacionado con tres entidades hematológicas: anemia por deficiencia de vitamina B12, púrpura trombocitopénica inmune y anemia por deficiencia de hierro. Con respecto a esta última, la asociación ha sido conclusivamente demostrada en adultos y en niños, la Sociedad Británica de Gastroenterología considera que es tan fuerte la asociación que, en pacientes con anemia ferropénica, se debe investigar y erradicar la infección si esta es positiva y la endoscopia negativa para causas de anemia. *H. pylori* también puede aumentar el riesgo tanto para pólipos adenomatosos como para cáncer de colon. La asociación parece ser más fuerte para los cánceres distales y la tendencia

observada en la disminución de este último tumor en países industrializados, podría estar relacionada con la disminución de esta infección. Por su participación etiológica en diversas entidades clínicas, *H. pylori* genera un enorme impacto en la vida y en los sistemas de salud, por lo cual sigue siendo vigente la necesidad de investigarlo en diferentes aspectos: sus factores de virulencia, la interacción con el hospedero, la respuesta inmune, estrategias para erradicarlo con antibióticos y su prevención mediante el desarrollo de vacunas terapéuticas, que además podrían proteger contra el cáncer gástrico. ⁽²⁸⁾

3.9 Vías de transmisión

La transmisión de *H. pylori* es principalmente por vía oral-oral y fecal-oral; la primera debido a la presencia transitoria de bacterias en la boca que se pueden transmitir por compartir utensilios, y la segunda por beber fuentes de agua o alimentos contaminados los cuales actúan como reservorios temporales para la bacteria. Esta capacidad de transmisión se debe en primera instancia a la capacidad de supervivencia temporal al medio ambiente que presenta la bacteria y por la presencia de factores de riesgos que facilitan la propagación del microorganismo. La infección se da principalmente durante la infancia, aunque las manifestaciones se presentan en la vida adulta tardía. ⁽²⁴⁾

Las técnicas empleadas para el diagnóstico de la infección por *H. pylori* se pueden dividir en métodos invasivos como la endoscopia gástrica para la obtención de biopsias, cultivo, PCR, y técnicas no invasivas, que son menos agresivas para el paciente. ⁽²⁹⁾

3.10 Efectos patológicos en el organismo humano

Este microorganismo posee una gran capacidad para sobrevivir en uno de los ambientes más inhóspitos de nuestro organismo: el estómago, que presenta un

medio extremadamente ácido, con un pH inferior a 4. La acidez del estómago es uno de los mecanismos de defensa de nuestro organismo contra las bacterias que son ingeridas con los alimentos. No obstante, *H. pylori* presenta factores de patogenicidad que le permiten adaptarse al medio, produciendo sustancias que neutralizan los ácidos y formando una especie de nube protectora a su alrededor, lo que permite a la bacteria diseminarse dentro del estómago hasta encontrar un sitio para adherirse. Además de esta protección, *H. pylori* logra superar la barrera de moco que el estómago posee para protegerse de la acidez adhiriéndose al moco, área debajo de la mucosa, donde la acidez es menos fuerte. Esta capa es esencial para la protección del estómago, pues impide que el ácido clorhídrico agreda a su mucosa. ⁽³⁰⁾

Las enzimas que permiten la supervivencia de *H. pylori* son cuatro: ureasa, catalasa, fosfolipasa y proteasa. Dichos catalizadores permiten la supervivencia en el ambiente gástrico y lesionar la mucosa. La ureasa produce amoníaco que es un tóxico celular. La catalasa protege contra la peroxidación de los polimorfonucleares. La fosfolipasa y la proteasa permiten la digestión de las membranas de las células epiteliales y de la barrera mucosa e incrementan la humidificación y solubilidad del moco. ⁽²⁷⁾

A pesar de la gran incidencia de infección por *H. pylori* a nivel mundial, no todas las personas infectadas por este patógeno desarrollarán una enfermedad. Al parecer, el resultado de una patología gástrica es la suma de varios factores, como la predisposición genética del hospedero a desarrollar una úlcera o cáncer gástrico, el genotipo de la cepa que se encuentra colonizando la mucosa gástrica y el medio ambiente. ⁽³⁰⁾

3.10.1 Inflamación crónica

La inflamación crónica causada por el *H. pylori* consiste en la presencia en el lugar del daño tisular de linfocitos y células plasmáticas capaces de segregar

inmunoglobulinas tipo IgG e IgA. Estas pueden verse en la lámina propia de los pacientes infectados. Estos anticuerpos sirven para diagnosticar la presencia del *H. pylori* cuando se determinan en el suero o en la saliva. La IgG tiene más sensibilidad, aunque los títulos de IgA descienden antes cuando el *H. pylori* se erradica, por lo que indican la curación de la infección de forma más temprana que la IgG. ⁽²⁷⁾

3.10.2 Gastritis crónica

Es una enfermedad inflamatoria crónica de la mucosa estomacal, que puede generar desde la atrofia leve de la mucosa hasta el desarrollo de adenocarcinomas. Las causas de esta atrofia son múltiples, sin embargo, la mayoría son debidas a la presencia del *H. pylori*, pues la respuesta inflamatoria desarrollada induce la apoptosis del epitelio gástrico. Otras causas de gastritis crónica son las de origen inmunológico como anticuerpos citotóxicos o contra el factor intrínseco, el consumo recurrente de alcohol, el tabaquismo, y la radiación. Si bien la gastritis crónica se caracteriza por estar eritematosa con pliegues aumentados de tamaño en un comienzo, estos suelen volverse aplanados y finos por el mencionado daño epitelial. Morfológicamente la gastritis crónica, tiene varios patrones de presentación sin embargo con la infección por la bacteria la tendencia es a encontrar la lesión limitada a la zona del antro. ⁽²⁴⁾

3.10.3 Dispepsia funcional

Si bien el rol del *H. pylori* en la dispepsia funcional no está bien determinado. De acuerdo a estudios existentes, se comprobó que el tratamiento para *H. pylori* en pacientes con dispepsia funcional tiene pocos, pero significativos efectos en el alivio de síntomas de la dispepsia. La dispepsia es un problema de marcada reiteración en la población general, aunque hasta el momento no existe un

consenso que la defina. La dispepsia es un "síntoma o conjunto de síntomas, que se considera tiene su origen en la región gastroduodenal". (27)

3.10.4 Úlcera péptica

En términos generales, la úlcera se considera una pérdida de la continuidad del epitelio. En el caso de la úlcera péptica, la ubicación más frecuente es la primera porción del duodeno. Esta lesión se ha asociado a diferentes patologías, pero la principal relación es con la presencia del bacilo bien sea en el antro o en el duodeno. La presencia en el antro favorece el aumento en la cantidad de ácido que llega al duodeno lo cual daña el epitelio, mientras que la presencia en el duodeno, favorece la formación de úlceras mediante la acción de las células dendríticas y la subsiguiente activación de la respuesta inmune. La severidad de la úlcera va a depender en gran medida de la presencia de cepas cagA positivas, así como con la carga bacteriana, y la edad del paciente, presentando un curso clínico diferente en adultos mayores, caracterizado por epigastralgia así como complicaciones de las úlceras. Esta es una de las patologías que se ve favorecida con la erradicación del microorganismo, entre otras cosas por la disminución de la respuesta inmune inflamatoria y el daño generado al epitelio gástrico. (24)

La infección por *H.pylori* y el consumo de medicamentos antiinflamatorios no esteroideos, son los principales factores de riesgo para el desarrollo de complicaciones de la úlcera péptica, su erradicación mejora las tasas de curación y disminuye las complicaciones, incluyendo el sangrado y la recurrencia. (31)

3.10.5 Cáncer gástrico

H. pylori es uno de los principales patógenos de la humanidad. Diez años después de su descubrimiento, la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer de la OMS (IARC) lo catalogó como carcinógeno tipo I o carcinógeno definido. (28)

Se considera que la fuerza que promueve el proceso precanceroso es la infección por *H. pylori*, ya que existe una relación directa de causalidad con la infección, la cual está modulada por la interacción de tres grupos de fuerzas etiológicas relacionadas entre sí que son las asociadas a la bacteria, al huésped y al ambiente externo. La relación de estos factores hace que la mucosa gástrica normal se convierta en una gastritis crónica, que puede evolucionar a una gastritis no atrófica no asociada a riesgo alto de cáncer, o a una gastritis multifocal atrófica con metaplasia intestinal, y un alto riesgo de cáncer. ⁽³²⁾

Otra hipótesis de carcinogénesis por *H. pylori* propone que la infección induce daño al ADN por enzimas oncogénicas como la sintetasa inducible de óxido nítrico y la espermino-oxidasa. Ambas enzimas son inducidas en macrófagos y en células epiteliales en mayor nivel por cepas de *H. pylori*. ⁽³²⁾

Aproximadamente el 50 a 70% de las cepas de *H. Pylori*, posee el gen *cagA*, el cual es un marcador de una isla de patogenicidad (*cag PAI*) constituida por 31 genes. Las cepas de *H. Pylori* que presentan el gen *cagA* han sido asociadas con ulceración péptica y con cáncer gástrico. ⁽³²⁾

3.10.6 Linfoma tipo MALT

Es un tipo de linfoma que puede afectar a diversos órganos del cuerpo humano, entre otros al estómago (linfoma MALT gástrico). El término "MALT" es el acrónimo de "tejido linfoide asociado a mucosas". Los linfomas pueden estar constituidos por dos tipos de células (linfocitos): de tipo B (entre los que se encuentra el linfoma MALT) y de tipo T. En general, los linfomas de tipo B son más benignos que los de tipo T. ⁽³³⁾

La mayoría (aproximadamente el 90 %) de los linfomas MALT aparecen en personas infectadas por el *H. pylori*. Esta bacteria es la responsable de que aparezca una gastritis de un tipo especial, con abundantes folículos linfoides; y estas lesiones son un requisito necesario para el posterior desarrollo del linfoma

MALT, en el que las células malignas (los linfocitos) terminan infiltrando las glándulas del estómago. ⁽³³⁾

El tratamiento antibiótico frente a *H. pylori* es suficiente en los linfomas MALT de bajo grado y estadios iniciales, que son la mayoría, mientras que en el resto de los linfomas MALT gástricos (de alto grado o en estadios más avanzados) la erradicación de esta infección constituye solo una parte del tratamiento, debiendo recurrirse a otras terapias complementarias (como la quimioterapia, la radioterapia o, más raramente, la cirugía). ⁽³³⁾

3.11 Tratamientos erradicadores de *Helicobacter pylori*

Las pautas de tratamiento para erradicar esta bacteria combinan 2 o 3 antimicrobianos junto con un compuesto antiulceroso que son los inhibidores de bomba de protones (omeprazol, lansoprazol, pantoprazol, rabeprazol y esomeprazol), que permite modificar el pH para que actúe el antibiótico. ⁽²⁷⁾

No hay medicamentos exclusivos para erradicar al *H. pylori*. Desde hace décadas se dispone de los mismos antibióticos: bismuto, amoxicilina, tetraciclina, claritromicina, metronidazol y furazolidona. Más recientemente quinolonas como levofloxacin, sitafloxacin, gatifloxacin, moxifloxacin y rifabutina. Las fluoroquinolonas, macrólidos e imidazoles, tienen resistencia cruzada con los de la misma clase. El aumento progresivo de la resistencia de *H. pylori* a los antimicrobianos ha determinado que en la actualidad la eficacia de las terapias triples es de 60-70%, en contraste con 90% o más del pasado. Los esquemas para erradicar *H. pylori*, se construyen con los antibióticos clásicos, en diferentes combinaciones y dosis asociados a altas dosis de IBP. Cuando *H. pylori* se expone a antibióticos que no lo erradican, desarrolla resistencia secundaria a los mismos. ⁽²⁶⁾

El *H. pylori* resistente a claritromicina, ha sido incluido en la reciente lista de la OMS, como uno de los 16 microorganismos considerados una amenaza para la humanidad y que exigen todos los esfuerzos para erradicarlos. Dicho bacilo, rara vez es resistente a amoxicilina, tetraciclina, furazolidona y rifabutina. La resistencia a esos antibióticos es de 0-2%, menor a 1%, <3% y 0,6 a 1,3% respectivamente. ⁽²⁶⁾

Para considerar que un tratamiento es efectivo y que erradica al *H. pylori*, este debe ser capaz de curar la infección en un porcentaje de al menos el 90% de los pacientes. En el éxito de los tratamientos, influyen los siguientes factores: resistencia de la cepa de *H. pylori* a la combinación de los antibióticos usados, historia previa de consumo de antibióticos por parte del paciente, adherencia al tratamiento por parte del paciente respecto a la toma de medicación, supresión ácida potente, duración del régimen terapéutico y elección adecuada de la antibioticoterapia. ⁽³¹⁾

3.11.1 Resistencia antibiótica

De particular importancia es el hecho que el *H. pylori* se protege del ácido y los antibióticos al estar inmerso en la capa de moco. Cuando los antibióticos llegan al estómago, se desplazan hacia el intestino, perdiéndose el efecto tópico de los mismos y determinando que su acción sea fundamentalmente sistémica. Varios antibióticos utilizados disminuyen su actividad por el ácido del estómago. La eficacia de otros antibióticos como: sales de bismuto, tetraciclina y metronidazol, no es influida por el ácido. Sin embargo, la claritromicina es particularmente sensible al ácido, el cual favorece su degradación, con una vida media de una hora a un pH en 2. ⁽³¹⁾

Otros dos factores importantes son el efecto del inóculo y el efecto del biofilm. El primero hace referencia a que el *H. pylori*, de manera similar a otras bacterias, en poblaciones en donde existen altas concentraciones del microorganismo, hay

cepas dentro de la población, que no se replican (durmientes) y, por lo tanto, pueden sobrevivir durante la antibioticoterapia, sin que necesariamente sean resistentes al antibiótico. El biofilm es un conjunto de microorganismos, que crecen unidos entre sí, adheridos a superficies o interfaces y envueltos por una matriz de exopolisacáridos que los protege de la acción de los antibióticos. Recientemente, se demostró que el *H. pylori* puede formar biofilm *in vivo*, el cual puede ser un importante mecanismo de persistencia de la infección y protección contra los antimicrobianos. ⁽³¹⁾

3.12 Métodos de sensibilidad antimicrobiana

Las pruebas de sensibilidad o antibiogramas determinan la susceptibilidad de un microorganismo frente a los medicamentos antimicrobianos, a partir de la exposición de una concentración estandarizada del germen a estos fármacos. Las pruebas de sensibilidad pueden hacerse para bacterias, hongos o virus. Para algunos microorganismos, los resultados obtenidos con un fármaco permiten predecir los resultados que se obtendrán con fármacos similares. Así, no todos los medicamentos potencialmente útiles necesitan probarse. ⁽³⁴⁾

Las pruebas de sensibilidad se realizan *in vitro*, y no tienen en cuenta numerosos factores que afectan al fármaco *in vivo* (p. ej., la farmacodinámica y la farmacocinética, las concentraciones del medicamento en el sitio de acción, el estado inmunitario del huésped, las defensas específicas de sitio) y que influyen en el éxito de un tratamiento. Por ello, las pruebas de sensibilidad no siempre predicen los resultados de la terapia. ⁽³⁴⁾

Las pruebas de sensibilidad pueden ser cualitativas, semicuantitativas o con métodos basados en los ácidos nucleicos. Las pruebas también pueden determinar el efecto de la combinación de distintos antimicrobianos (pruebas de sinergia). ⁽³⁴⁾

3.12.1 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. 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. 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. 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.

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. ⁽²¹⁾

3.12.2 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. 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 o película plásticas autoadhesiva, debido a las ventajas mencionadas se utilizará esta técnica en este estudio. 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. 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 μ L 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.

Existe una clasificación de resultados para CMI, con lo cual se pueden obtener los siguientes resultados: actividad fuerte CMI <10 μ g/mL, actividad fuerte a moderada CMI entre 10-100 μ g/mL, actividad débil a moderada CMI entre 100-1000 μ g/mL, actividad débil CMI >1000 μ g/mL. ⁽²¹⁾

3.12.3 Determinación de la actividad antimicrobiana utilizando la técnica de ajedrez.

El método del tablero de ajedrez es la técnica que se ha utilizado con mayor frecuencia para evaluar las combinaciones de antimicrobianos in vitro, presumiblemente porque su fundamento es fácil de entender, las matemáticas necesarias para calcular e interpretar los resultados son simples, se puede realizar en laboratorios de microbiología utilizando equipos que están fácilmente disponibles, y ha sido la técnica más utilizada con frecuencia en estudios que han sugerido una ventaja de la terapia sinérgica en el tratamiento de pacientes neutropénicos con Gram-septicemia negativa. El término "tablero de ajedrez" se refiere al patrón (de tubos o pocillos de microvaloración o placas de agar) formado por múltiples diluciones de los dos antimicrobianos que se están probando, en concentraciones iguales, por encima y por debajo de su CMI frente a los organismos que se están analizando. (35)

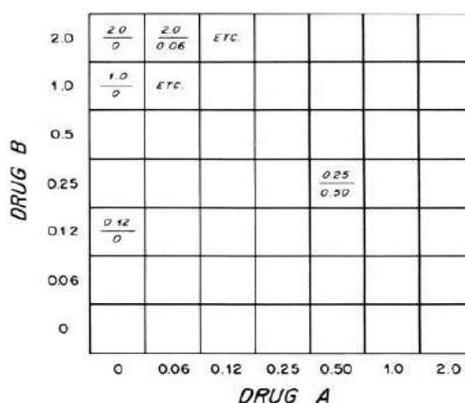


Figura N° 1. Técnica del tablero de ajedrez.

En el tablero de ajedrez, se realizan diluciones en serie 1:2. Se utilizan concentraciones de fármaco proporcionales a las CMI de los fármacos que están siendo probados. (Aunque generalmente se expresa en microgramos por mililitro, estas concentraciones de los fármacos A y B se expresan aquí como múltiplos de la CMI (Ver Figura N°1). (35)

Las concentraciones analizadas para cada antimicrobiano suelen oscilar entre cuatro o cinco diluciones por debajo de la CMI esperada hasta el doble de la CMI anticipada (o más alta si se sospecha antagonismo), utilizando diluciones dobles de cada antimicrobiano. También se incluye una fila (o columna) de tubos o pocillos para cada fármaco solos, sin ninguna cantidad del segundo antimicrobiano. Así, el tablero de ajedrez consta de columnas en las que cada tubo (o pocillo o placa) contiene la misma cantidad de fármaco (fármaco A) que se diluye a lo largo del eje X, en las que cada tubo o placa contiene la misma cantidad del medicamento (fármaco B) de ser diluido en el Eje Y (Figura N° 2). El resultado es que cada cuadrado en el tablero de ajedrez (que representa un tubo o pocillo) contiene una combinación única de los dos medicamentos que se están probando. Las diluciones de los antimicrobianos que se están probando generalmente se realizan en caldo Mueller-Hinton u otro caldo adecuado para estudios bacterianos, de modo que las soluciones que contienen fármaco pueden mezclarse con un medio sin fármaco para producir las concentraciones finales designadas en el diagrama. (35)

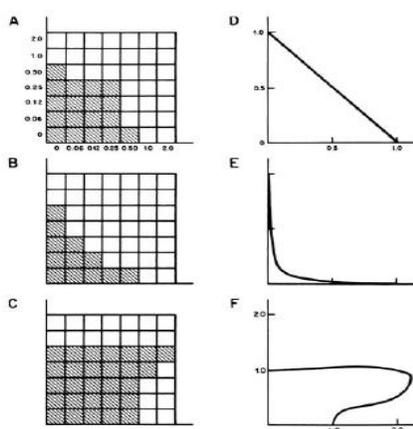


Figura N° 2. Evaluación de la interacción de antimicrobianos mediante el método del tablero de ajedrez. (35)

Aunque las diluciones utilizadas en el tablero de ajedrez son exponenciales (en potencias de dos) (Figura N° 1), los resultados de las pruebas de tablero de ajedrez son interpretados por el patrón que forman en el isoblograma (que convierte esos datos de una escala exponencial logarítmica a una aritmética) (Figura N° 2). En la figura 2 A a C, se muestran los resultados experimentales (el sombreado indica un crecimiento observable) que corresponde a interacciones aditivas (Figura 2 A), sinérgicas (Figura 2 B) y antagonistas (Figura 2 C), como se muestra en el diagrama del isoblograma en Figura N° 2, D, E y F, respectivamente. El isoblograma se construye de la siguiente manera. Para cada concentración de fármaco a lo largo del eje [x -] (trazado como la coordenada [x -]), se toma la concentración más baja del fármaco diluido a lo largo del eje [y -] que inhibe el crecimiento en la columna de tubos como la coordenada [y -] de este gráfico. Un isoblograma se construye conectando la serie de puntos de coordenadas generados para cada fármaco en combinación que forma el límite de "escalón" entre la inhibición y el crecimiento en el tablero de ajedrez. ⁽³⁵⁾

3.12.3.1. Definición del punto final

La mayoría de las pruebas de tablero de ajedrez se leen examinando los tubos (o pozos o placas) en busca de evidencia de crecimiento visible después de 16 a 20 horas de incubación a 35 ° C a 37 ° C.

En ocasiones, los criterios de valoración pueden determinarse antes para los organismos de crecimiento rápido o pueden requerir una incubación más prolongada para los aislados de crecimiento lento. Se pueden obtener datos bactericidas si se toman muestras de los tubos (o pocillos) sin evidencia visible de crecimiento bacteriano para determinar las concentraciones de la combinación produciendo el 99,9% de muerte (CMB). De manera similar, algunos investigadores han modificado la determinación (y la definición) de la CMI utilizando una reducción del 50% en la densidad óptica producida por el

crecimiento bacteriano para reemplazar la inspección visual. Creen que esta medida (la concentración inhibitoria del 50%), cuando se evalúa con un espectrofotómetro, puede ser más preciso que la determinación de CMI tradicional. ⁽³⁵⁾

3.12.3.2. Interpretación de los resultados

Al interpretar los resultados de los estudios de tablero de ajedrez, la pregunta crítica suele ser si una combinación aparentemente sinérgica está significativamente por debajo de la línea aditiva del isoblograma. Debido a que el margen de error en estos estudios es más o menos una dilución, una combinación debería inhibir el crecimiento (o lograr matar) al menos dos diluciones por debajo de la línea de aditivo del isoblograma para ser considerado sinérgico o al menos dos diluciones por encima de la línea de aditivo para ser considerado antagónico. Debido a que la determinación del sinergismo a menudo depende de los tubos (pozos) cerca del punto medio del isoblograma, muchos trabajadores han examinado solo la CMI (o CMB) y una concentración más baja de cada fármaco solo, además de un grupo de concentraciones comparativamente crecientes de ambos medicamentos (en una proporción de sus CMI o CMB), comenzando desde el control (sin medicamento A o B) y progresando hacia el punto con $x =$ la mitad de la CMI del medicamento A, $y =$ la mitad de la CMI del fármaco B. Este esquema reduce sustancialmente el número de tubos y diluciones necesarios para realizar la prueba, mientras retiene discriminación suficiente en el punto medio para definir sinergismo en la mayoría de los casos. El índice FIC de Elion puede verse como una matemática reformulación del isoblograma y es el método más comúnmente utilizado en la literatura para informar los resultados de estudios con combinaciones de antimicrobianos. En este método, el FIC de cada fármaco se obtiene dividiendo la concentración de ese fármaco necesaria para inhibir el crecimiento en una fila o columna determinada por la CMI del organismo de prueba para ese fármaco

solo. Luego, el índice FIC se calcula sumando los FIC separados para cada uno de los medicamentos presentes en ese tubo (o bien) en dosis proporcionales a sus CMI. Además, puede ser importante detectar un sinergismo o antagonismo significativo que se produce en el momento de tener concentraciones del fármaco fuera de la línea de 45 grados, si tales concentraciones son clínicamente relevantes. ⁽³⁵⁾

3.12.3.3. Cálculo del índice de concentración inhibitoria fraccional (FIC) para combinaciones de dos antimicrobianos.

$$\frac{(A)}{(MIC_A)} + \frac{(B)}{(MIC_B)} = FIC_A + FIC_B = FIC \text{ index}$$

Figura N° 3. Fórmula para determinación de índice FIC.

En donde (A) es la concentración de fármaco A en un tubo que tiene la concentración inhibitoria más baja de su fila. (MIC_A) es la CMI del organismo de droga A sola. FIC_A es la concentración inhibitoria fraccional del fármaco A. (B) es la concentración del fármaco B en un tubo que es la más baja concentración inhibitoria en su columna. (MIC_B) y FIC_B se definen de la misma manera para el fármaco B. ⁽³⁵⁾

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 $\sum CFI > 4$ ⁽⁶⁾. Criterios más recientes sugieren que se debería aplicar un índice FIC de más de 4 a definiciones de antagonismo para tener en cuenta la imprecisión inherente de la técnica cuando se utilizan diluciones dobles y debido al índice FIC de 2.0 es probablemente indicativo de un efecto indiferente, en lugar de un verdadero antagonismo. En algunos casos, puede ser apropiado utilizar una definición rigurosa de sinergismo (por ejemplo, un índice FIC de

menos de 0.5) para discriminar más completamente entre sinérgico y efectos aditivos. Aunque la mayoría de los investigadores utilizan el cálculo del índice FIC solo para combinaciones de dos fármacos, este enfoque se puede aplicar a combinaciones de tres o más fármacos. ⁽³⁵⁾

3.13 Cinética de muerte

En contraste con la técnica del tablero de ajedrez, que generalmente proporciona solo datos inhibitorios, la técnica de la curva de muerte mide la actividad microbicida de la combinación que se está probando. Por esta razón, a menudo es más relevante para situaciones clínicas en las que la terapia bactericida es deseable. La otra gran ventaja de cinética de muerte sobre la técnica del tablero de ajedrez es que proporcionan una imagen dinámica de acción e interacción antimicrobiana a lo largo del tiempo (basada en recuentos de colonias en serie), a diferencia de la técnica del tablero de ajedrez, que generalmente es examinado solo una vez (después de 16 a 24 horas de incubación). Sin embargo, los conteos repetitivos de colonias que requiere esta técnica son tediosos y limitan seriamente el número de concentraciones de antimicrobianos y combinaciones que se pueden probar con cualquier aislado. Por lo tanto, si los resultados de laboratorio han de ser útiles para orientar la terapia, es esencial que las concentraciones de antimicrobianos probadas se elijan cuidadosamente y que representen concentraciones que son alcanzable en el presunto sitio de infección. Debido a que el medio se muestrea repetidamente para el recuento de colonias, los estudios de la curva de muerte se deben realizar en medios líquidos y se requiere cuidado para evitar la contaminación. La mayoría de los experimentos se realizan con un inóculo final de 10^5 a 10^7 UFC/mL, que se produce diluyendo un cultivo nocturno del patógeno en caldo Mueller-Hinton ajustado por cationes u otro caldo adecuado. Por lo general, es conveniente ajustar primero el cultivo de la noche a la mañana (o el cultivo de fase logarítmica

si se desea) para que coincida con el estándar 0,5 McFarland y luego diluir por segunda vez con caldo fresco y las cantidades apropiadas de antimicrobianos en el tubo o matraz en que se va a realizar el estudio. ⁽³⁵⁾

El muestreo inicial para el recuento de colonias debe realizarse tan pronto como se agregue el inóculo (dentro de 5 minutos). Suponiendo que el volumen del cultivo es de al menos 10 mL, generalmente es conveniente tomar muestras de 0,5 mL para el recuento de colonias que puede realizarse mediante uno de varios métodos. Especialmente si se utilizan intervalos de muestreo cortos, los matraces de cultivo deben ser devueltos a la incubadora inmediatamente después de que se hayan extraído las alícuotas (ver Figura N° 4). ⁽³⁵⁾

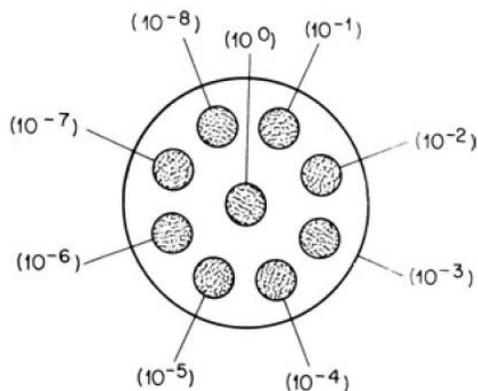


Figura N° 4. Disposición de gotas de caldo de cultivo en una placa de agar para contar las unidades formadoras de colonias por mililitro. ⁽³⁵⁾

CAPITULO IV
DISEÑO METODOLOGICO

4.0 DISEÑO METODOLOGICO

4.1. Tipo de estudio

- **Experimental de laboratorio:** se prepararon extractos hidroalcohólicos de tres muestras de propóleo, encontradas y liofilizadas en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador. Estos extractos fueron utilizados para la determinación de la actividad antimicrobiana frente a *Helicobacter pylori* NCTC 11637, mediante los ensayos: difusión en agar, concentración mínima inhibitoria, concentración por el método de microdilución, técnica de tablero de ajedrez y cinética de muerte.
- **Exploratorio:** la propiedad antimicrobiana del propóleo salvadoreño ya ha sido estudiado en el país frente algunos microorganismos; sin embargo, es la primera vez que se realizó frente a una cepa de *Helicobacter pylori*.

4.2. Investigación bibliográfica:

Se realizó consultas en las siguientes bibliotecas:

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

4.3. Investigación de campo

Las muestras de propóleo fueron recolectadas de diferentes zonas apícolas del país distribuidas en los departamentos de La Libertad, Morazán y La Unión (Ver Anexo N°3).

- **Universo:** Total de colmenas de apiarios ubicados en los departamentos de La Libertad, Morazán y La Unión.
- **Muestra:** La recolección del propóleo crudo, se llevó a cabo por el método de raspado por los apicultores de tres municipios de El Salvador (Huizúcar, Chilanga y San Alejo).

4.3.1. Ubicación y recolección de muestras del propóleo crudo

Las muestras de propóleo crudo se recolectaron aleatoriamente de cuatro a seis colmenas de los apiarios seleccionados, hasta alcanzar un peso entre los 50 y

60 gramos por muestra y se codificaron según su procedencia según las localidades geográficas del país como se muestra en el Anexo N°4 y N°5

4.4. Parte experimental

Las muestras de extracto hidroalcohólico de propóleo fueron proporcionadas por la Facultad de Química y Farmacia y se encontraron almacenadas e identificadas de acuerdo al lugar de procedencia en el Laboratorio de Microbiología. Las muestras de Extractos hidroalcohólicos se hallaron en estado liofilizado a una temperatura de 4 °C a 8°C, por tanto, no fue necesaria la extracción de algún solvente, agua, grasas o clorofila; ya que estas muestras fueron recolectadas y utilizadas por los grupos de profesionales investigadores Núñez y Umazor ⁽²¹⁾ y también por Figueroa y Beltrán ⁽³⁶⁾. Es así que se procedió directamente a disolver y preparar las diluciones de los extractos hidroalcohólicos de propóleo a utilizar. (Ver Anexo N°4). Para realizar la parte experimental tomar en cuenta los materiales, reactivos y equipo a utilizar (Ver Anexo N°6).

4.4.1. Preparación de solución madre y diluciones de los extractos de los propóleos.

Se preparó la solución madre con sus respectivas diluciones para cada una de las muestras de propóleo pertenecientes a las zonas de: Chilanga, departamento de Morazán, Huizúcar, departamento de La Libertad y San Alejo, departamento de La Unión. La técnica que se llevó a cabo es la siguiente:

- Preparar una solución madre pesando la cantidad de 1.00 gramo de extracto hidroalcohólico de propóleo liofilizado y disolver en 10mL de Etanol al 70%.
- Tomar alícuotas de la solución madre de 0.4 mL, 0.3 mL, 0.2 mL y 0.1 mL.
- Transferir cada una a 4 tubos eppendorf respectivamente.
- Aforar con DMSO al 10% hasta alcanzar un volumen de 2 mL y obtener las concentraciones de 20,000 µg/mL, 15,000 µg/mL, 10,000 µg/mL y 5,000 µg/mL. Ver esquema de figura N° 18.

Nota: Se realizó el procedimiento para cada una de las tres muestras de extracto hidroalcohólico de propóleo. (Ver Anexo 7, Figura 18).

4.4.2. Preparación de cultivo de trabajo ⁽²³⁾ ⁽³⁷⁾

Para la preparación del cultivo se utilizó la bacteria perteneciente al cepario del Laboratorio de Control de Calidad Microbiológico de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.

Para el cultivo de la cepa de *Helicobacter pylori* NCTC 11637 se utilizó el siguiente procedimiento (ver Figura N° 19):

- Preparar medio de cultivo Agar Columbia con 8% de sangre desfibrinada y suplemento DENT al 1%.
- Tomar con un hisopo de la cepa y esparcir por toda la placa.
- Incubar a 37°C, 5% de CO₂ de 48 a 72 horas.
- Tomar del microorganismo de las placas y suspender en solución salina estéril.
- Leer en espectrofotómetro UV/VIS a 580 nm, y ajustar la suspensión de microorganismos a un porcentaje de Transmittancia entre 25-35%T.

4.4.3. Procedimiento para el método de difusión en agar. ^{(21) (22)}

- Preparar placas petri con 20 mL de Agar Müller-Hinton con 5% de sangre desfibrinada y suplemento Dent al 1%.
- Realizar los pocillos de 7 mm de diámetro en el medio de cultivo, separados aproximadamente 20 mm entre sí, de modo que, se realicen 5 pocillos por placa.
- Tomar con un hisopo de algodón estéril, de la suspensión de microorganismos correspondiente previamente estandarizada a 1×10^8 UFC/mL, y esparcir en las cajas cubriendo toda la placa.
- Agregar en los pocillos correspondientes 50 µL de a las concentraciones de 20,000 µg/mL, 15,000 µg/mL, 10,000 µg/mL y 5,000 µg/mL.
- Agregar en los pocillos correspondientes 50 µL de Claritromicina a la concentración de 1,000 µg/mL (control positivo) y Dimetilsulfóxido (DMSO) 10% (control negativo).
- Dejar reposar aproximadamente 20 min para permitir la difusión en el agar.
- Incubar a 37°C, 5% de CO₂ de 48 a 72 horas.
- Medir los halos con un pie de rey (mm).

Nota: Se realizó el ensayo por triplicado (ver Figura N° 20).

4.4.4. Concentración mínima inhibitoria ⁽³⁸⁾

Dicho procedimiento, se llevó a cabo con la muestra de extracto de propóleo que presentó actividad inhibitoria en el ensayo de difusión en agar (Ver Figura N° 21):

- Preparar una solución de madre de extracto hidroalcohólico de propóleo a la concentración de 100,140 µg/mL
- Realizar diluciones seriadas a partir de la Solución madre con DMSO 10% a las concentraciones de 80,000µg/mL, 70,000µg/mL, 60,000µg/mL, 50,000µg/mL, 40,000µg/mL, 30,000µg/mL, 25,000µg/mL, 20,000µg/mL, 10,000 µg/mL de extracto hidroalcohólico de propóleo.
- La microplaca contará con 12 columnas y 8 filas. Las columnas de la 1 a la 9 corresponden a las concentraciones de extracto hidroalcohólico de propóleo de mayor a menor. La columna 10 corresponde al control negativo de crecimiento conteniendo medio de cultivo. La columna 11 corresponde al control de crecimiento conteniendo medio de cultivo y microorganismo. La columna 12 corresponde al control positivo de inhibición conteniendo medio de cultivo con microorganismo y Claritromicina a 1000 µg/mL.
- Las filas A, B, C y D corresponden al análisis por cuadruplicado utilizando el microorganismo en estudio.
- Llenar la placa de 96 pocillos por filas de la siguiente manera colocando 100 µL de caldo BHI con extracto de levadura al 5%, 100 µL de las diluciones de extracto hidroalcohólico de propóleo a la concentración respectiva y 10 µL de la cepa en estudio a la concentración de 1×10^8 UFC/mL, obteniendo finalmente en cada pocillo concentraciones de 38,095µg/mL, 33,333µg/mL, 28,571µg/mL, 23,810µg/mL, 19,048µg/mL, 14,285µg/mL, 11,905µg/mL, 9,524µg/mL, 4,762µg/mL de extracto hidroalcohólico de propóleo.
- Cubrir los pocillos.
- Incubar de 48 a 72 horas en microaerofilia (5% de CO₂) a 37°C
- Agregar a cada pocillo 10µL de resazurina a 440 micromolar (µM) como indicador metabólico.
- Incubar por 2 horas a 37° C.
- Observar el cambio de color y determinar la CMI.
- En otra placa de 96 pocillos realizar un ensayo para determinar la CMI de Claritromicina utilizando las siguientes concentraciones 64µg/mL, 32µg/mL, 16µg/mL, 4µg/mL, 1µg/mL, 0.5µg/mL, 0.1µg/mL, 0.05µg/mL y 0.025µg/mL seguir el mismo procedimiento que con el extracto de propóleo.

Nota: Una coloración rosada reveló crecimiento bacteriano y la coloración azul a morada indica inhibición de crecimiento.

4.4.5. Determinación del efecto antibiótico mediante el método de tablero de ajedrez. ^{(35) (38)}

Se realizaron las respectivas diluciones con DMSO al 10% a las siguientes concentraciones: 1,488µg/mL, 2,976µg/mL, 5,952µg/mL, 11,905µg/mL, 23,810µg/mL, 47,620µg/mL, 95,240µg/mL, 190,480µg/mL del extracto hidroalcohólico de propóleo perteneciente a la zona geográfica de Chilanga, Morazán. Las concentraciones utilizadas para el antibiótico de claritromicina fueron las siguientes: 4µg/mL, 8µg/mL, 16µg/mL, 32µg/mL, 64µg/mL, 128µg/mL, 256µg/mL. El caldo utilizado fue caldo BHI con levadura al 5%. (Ver Figura N° 22):

- Llenar cada pocillo de la microplaca de la siguiente manera: la primera columna con la serie de diluciones correspondientes al extracto hidroalcohólico de propóleo; la primera fila con las diluciones correspondientes al antibiótico; al pocillo que une a la fila y la columna, llenar solo con caldo adecuado y microorganismo, este corresponderá a la concentración de 0 µg/mL.
- Colocar en cada pocillo: 100 µL de caldo, 100 µL de extracto de propóleo, 100 µL del antibiótico, a la concentración respectiva. Agregar 10 µL de la suspensión de microorganismo a la concentración de 1×10^8 UFC/mL.
- Llenar los demás pocillos de la misma manera, a diferencia de que contendrán la mitad de antibiótico y la mitad de extracto de propóleo correspondiente a la concentración de cada fila y columna, es decir los 100 µL serán de la mezcla de ambos.
- Incubar durante 48-72 horas, a 37°C con 5% de CO₂.
- Agregar en cada pocillo 10 µL del indicador resazurina.
- 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.

Nota: Este ensayo se realizó combinando cada muestra de extracto hidroalcohólico de propóleo con el antibiótico claritromicina.

4.4.6. Cinética de muerte ^{(37) (38)}

Para la realización de este ensayo, se tomó muestra de la menor concentración a la que se observó inhibición del crecimiento. Dicho ensayo se realizó en solución salina estéril. Para la cepa de *Helicobacter pylori* NCTC 11637 se utilizó el antibiótico claritromicina (Ver Figura N° 23):

- Preparar una dilución de extracto hidroalcohólico de propóleo (EHP) a la concentración de 2,834.5 µg/mL y de Claritromicina a la concentración de 30 µg/mL,
- Preparar una suspensión bacteriana con 1×10^8 UFC/mL en solución salina estéril, Ver punto 2.4.2.
- Rotular tubos eppendorff con tiempos de 0h, 2h, 4h, 6h, 8h, 12h, 24h y agregarle a cada tubo 900 µL de solución salina estéril.
- Agregar en un tubo eppendorff la cantidad necesaria de suspensión de microorganismo y mezcla de extracto de propóleo con claritromicina a evaluar, de manera que, se obtenga un volumen final de 1,500 µL y una concentración final de extracto de propóleo y mezcla de claritromicina de 2.8345 mg/mL y 0.030 mg/mL respectivamente, obtenida en la evaluación del tablero de ajedrez.
- Inmediatamente realizada esta mezcla tomar muestra de 100 µL y agregarla al tubo que rotula el tiempo de 0 horas y realizar diluciones seriadas con solución salina estéril desde 10^{-1} hasta 10^{-8}
- Tomar una placa con agar Columbia suplementado con sangre de caballo defibrinada al 8% más suplemento Dent y dividirla en 8 secciones correspondiente a cada dilución.
- De cada dilución realizada tomar una muestra de 10µL (cantidad aproximada de una microgota) y colocarla en la sección correspondiente a la dilución (técnica de microgota).
- Incubar a 37°C con 5% de CO₂ de 48 a 72 horas el tubo eppendorff que contiene la mezcla de antibiótico con extracto de propóleo y microorganismos y la placa inoculada.
- Realizar el mismo procedimiento al transcurrir el periodo de tiempo correspondiente de 1 hora, 2 horas, 4 horas, 8 horas, 12 horas, 24 horas de haber realizado la mezcla de antibióticos.

Nota: las diluciones utilizadas fueron la mezcla de extracto de propóleo y antibiótico seleccionado, a las concentraciones en donde se observó un efecto de indiferencia en la técnica de Tablero de Ajedrez.

CAPITULO V
RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

5.0 CUMPLIMIENTO DE OBJETIVOS RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS

5.1 Preparación de cultivo de trabajo

Se realizó el cultivo de *Helicobacter pylori* NCTC 11637 en agar columbia suplementado con sangre desfibrinada de carnero al 8% y suplemento Dent al 1%. Para su crecimiento, fue necesario mantener el microorganismo bajo incubación de CO₂ al 5%, a una temperatura de 36.1 °C.

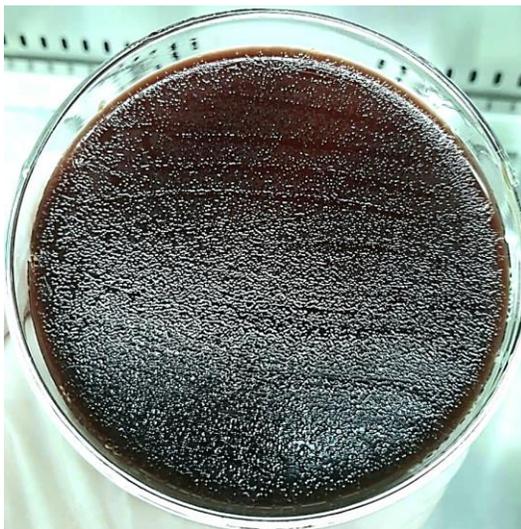


Figura N° 5. Cultivo de *Helicobacter pylori* NCTC 11637 en agar columbia suplementado con sangre de carnero desfibrinada al 8% y suplemento Dent al 1%.

Morfología macroscópica obtenida: colonias de circulares a puntiformes de color gris a transparentes, similares a gotas de lluvia (ver figura N°5); morfología

microscópica: bacilos largos Gram Negativos, curvados en forma de “S” (ver figura N°6).

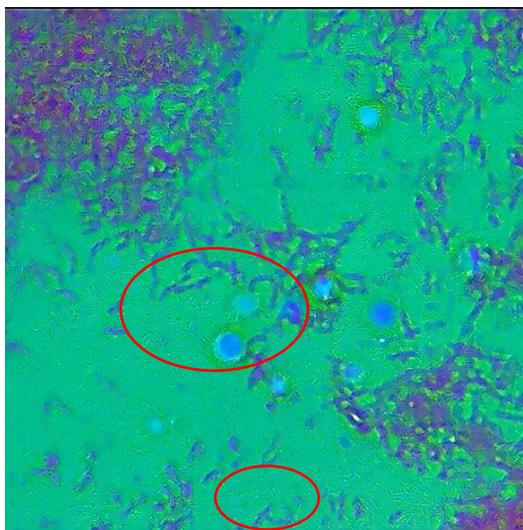


Figura N° 6. Resultados de la tinción de Gram. Bacilos largos Gramnegativos curvados.

5.2 Resultados de la evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos hidroalcohólicos de propóleo frente a *Helicobacter pylori* NCTC 11637 por los métodos de sensibilidad antimicrobiana: difusión en agar, concentración mínima inhibitoria.

Para el método de difusión en agar, se realizaron diluciones de las tres muestras de extractos hidroalcohólicos de propóleo (EHP) de 20,000 $\mu\text{g/mL}$, 15,000 $\mu\text{g/mL}$, 10,000 $\mu\text{g/mL}$ y 5,000 $\mu\text{g/mL}$. Se utilizó como control positivo estándar de claritromicina la concentración de 1000 $\mu\text{g/mL}$ y como control negativo el DMSO al 10%. Para determinar la concentración de la claritromicina utilizada se investigó los rangos existentes de algunos estudios anteriores frente al

Helicobacter pylori y luego se tomó aproximadamente el punto intermedio de estas concentraciones. ⁽³⁹⁾ ⁽⁴⁰⁾

Se evaluó la actividad antimicrobiana de los EHP y claritromicina realizando la lectura de la prueba de difusión en agar por medio de la medida de los halos de inhibición. Este ensayo se realizó para cada muestra de extracto, pero solamente se obtuvo resultados del EHP perteneciente a Chilanga presentando un halo de inhibición a la concentración más alta (Ver figura N° 7).

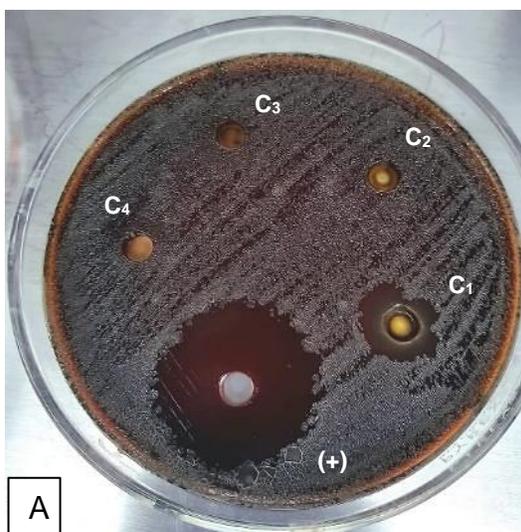


Figura N° 7. Resultados del método de difusión en agar. Extracto hidroalcohólico de propóleo perteneciente a Chilanga, Morazán.

El extracto de propóleo perteneciente al municipio de Chilanga, Morazán, presentó actividad antibacteriana, la cual fue demostrada por una zona de inhibición de 12 mm y una concentración de 20,000 $\mu\text{g/mL}$; así mismo el control positivo presentó una zona de inhibición de 25 mm (ver Figura N°7). El control negativo no presentó resultados debido a que no se obtuvo crecimiento bacteriano en la placa. Se realizó un estudio de una muestra de propóleo de la misma zona geográfica de Chilanga, Morazán, en la Universidad de El Salvador por Núñez y Umanzor ⁽²¹⁾; en el que obtuvieron actividad antimicrobiana frente a especies Gram negativas como: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y

Salmonella entérica serovar typhimurium. En ese estudio, a través del método de difusión en agar, las concentraciones del extracto hidroalcohólico del propóleo ensayadas fueron: 750 µg/mL, 1500 µg/mL, 3000 µg/mL. Según sus resultados, obtuvieron mayores zonas de inhibición frente a *E. coli* de 20mm-28mm, siendo proporcionales a las concentraciones ensayadas; la respuesta menor fue frente a *Pseudomonas aeruginosa*, obteniendo zonas de inhibición de 0mm-23mm, igualmente fueron proporcionales a las concentraciones ensayadas.

Asimismo, Méndez, ⁽⁸⁾ estudió los componentes secundarios del propóleo recolectado de la zona de Chilanga, Morazán. En el análisis fisicoquímico determinó flavonoides y triterpenos, los cuales son componentes que se les atribuye la actividad antimicrobiana. Es de considerar que la efectividad biológica del propóleo en estudio, pudo haberse visto disminuida por el tiempo en que las muestras han estado almacenadas y las condiciones de almacenamiento no han sido las adecuadas, ya que los componentes a los que se le confiere la actividad antimicrobiana, en este caso los flavonoides, pudieron haber sufrido algún tipo de oxidación en su estructura química y a consecuencia se alcanzó una zona de inhibición mucho menor a la que reportan Núñez y Umanzor. ⁽²¹⁾

En esta investigación no se obtuvo resultado de control negativo para el ensayo de difusión en agar utilizando DMSO al 10%; sin embargo, en el estudio realizado por Romero ⁽³⁸⁾, se comprobó la actividad anti *H. pylori* de 25 compuestos polifenólicos extraídos del propóleo recolectado de la región de Biobío, Chile. En dicho estudio, se utilizó igualmente DMSO al 10% como control negativo, obteniendo buenos resultados para las diferentes cepas utilizadas. Igualmente, en Cogo *et al* ⁽⁴¹⁾, utilizaron DMSO como diluyente en los controles de prueba y no reportaron resultados de interferencia en el ensayo. Por tanto, se toma como evidencia que el DMSO al 10% no interfirió en el crecimiento bacteriano de los ensayos realizados en los estudios mencionados, pero teniendo en cuenta que

las condiciones de los experimentos son totalmente diferentes por tanto no se tiene seguridad que en este estudio no haya sido un factor de interferencia.

Por otra parte, en el estudio realizado por Villanueva *et al*⁽⁴²⁾, se evaluó la actividad antibacteriana de 22 muestras de propóleo con orígenes botánicos procedentes de distintas zonas melíferas de Chile frente a 10 cepas de *H. pylori*. Los diámetros de inhibición fluctuaron entre 26-72 mm, en los pocillos que contenían entre 9 a 27 mg de propóleo por pocillo; el solvente (etanol puro), alcanzó halos de inhibición entre 7-11 mm. Por tanto, las concentraciones utilizadas fueron arriba de 300,000 µg/mL de propóleo y presentaron rangos de inhibición que superan al obtenido en el presente estudio. En cuanto a estos resultados Reyes *et al*⁽⁴³⁾ demostró que existe una proporcionalidad directa con la concentración de propóleo y la zona de inhibición. En Comparación con los resultados obtenidos en este estudio se determina que la cepa utilizada es más resistente a los EHP perteneciente a Chilanga, Morazán.

En el estudio realizado por Boyanova *et al*⁽⁴⁴⁾ utilizaron las mismas concentraciones de extracto de propóleo búlgaro que en Villanueva *et al*⁽⁴²⁾, y obtuvieron resultados similares frente a 94 cepas aisladas de *H. pylori*. La actividad del extracto etanólico al 30 % del propóleo búlgaro presentó una actividad dependiente de la dosis contra la mayoría de las cepas de *H. pylori* probadas. El 69.4% de las cepas en estudio presentaron halos de inhibición mayores a 20 mm, cuando se utilizó una concentración de 27 mg por pocillo, mostrando inhibición del 100% y obteniendo un diámetro medio de inhibición de crecimiento igual a 27.5 mm. Al mismo tiempo, utilizaron etanol al 96% como control y se demostró que el extracto de propóleo fue más activo que el etanol. Estos resultados demostraron ser más evidentes, ya que se usaron concentraciones más altas comparadas a la concentración inhibitoria del presente estudio, por tanto, se comprueba nuevamente la proporcionalidad directa entre la concentración y la zona de inhibición. Además, se comprueba que

la efectividad del propóleo como antimicrobiano va a depender de la zona geográfica de donde se recolectaron las muestras.

El ensayo de concentración mínima inhibitoria (CMI) se realizó únicamente con el extracto hidroalcohólico de la zona de Chilanga. Se visualizó el resultado de la CMI en el ensayo como el pocillo en el cual el color violeta oscuro o azul representa la inhibición del crecimiento microbiano tomando en cuenta que la concentración del antimicrobiano en estudio va disminuyendo de derecha a izquierda (ver Figura N° 8).

De acuerdo con los resultados, se observó que a partir de la columna número 5 hasta la N° 9, se presentó una coloración rosada tenue con una leve turbidez en la superficie del líquido contenido en los pocillos. Por tal razón, se determinó que la columna N° 4 contenía la CMI, correspondiente a la concentración de 23,810 $\mu\text{g/mL}$ (ver figura N° 8). Se obtuvo una coloración azul violeta para el control de crecimiento del medio (caldo BHI + levadura al 5%) y el control positivo de antibiótico ubicados en la columna N° 10 y N° 11. Es importante mencionar que, debido a la alta concentración de los extractos hidroalcohólicos de propóleo, fue difícil observar los colores característicos de la resazurina cuando identifica crecimiento o inhibición.

En el ensayo de CMI para claritromicina se observó crecimiento microbiano a partir de la columna N° 4 hasta la columna N° 9 (ver Figura N° 9), como resultado se determinó una CMI para claritromicina de 16 $\mu\text{g/mL}$, que corresponde a la concentración de la columna N° 3. En el control negativo (columna N° 10) se observó una coloración azul y en el control positivo de crecimiento (columna N°11) se observó una coloración rosada. El ensayo de CMI para claritromicina, permitió obtener un dato experimental.

Por ello se logró conseguir una concentración precisa y necesaria de dicho antibiótico capaz de inhibir al *H. pylori* y así, poder continuar con el ensayo de tablero de ajedrez.

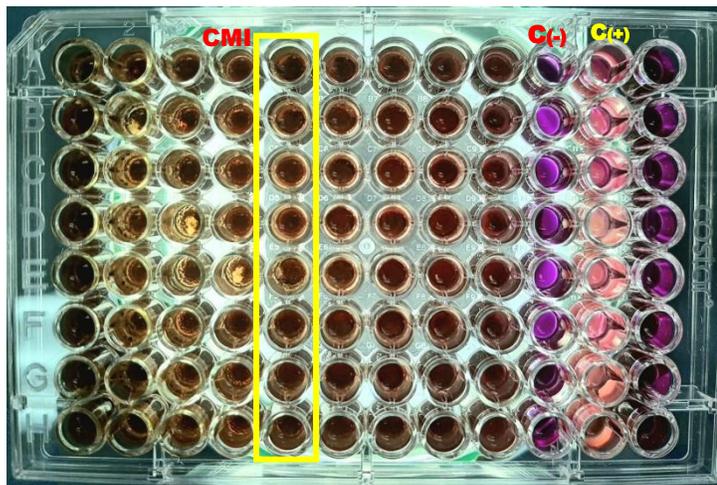


Figura N° 8. Ensayo de concentración mínima inhibitoria del extracto de propóleo de Chilanga frente a *Helicobacter pylori*.

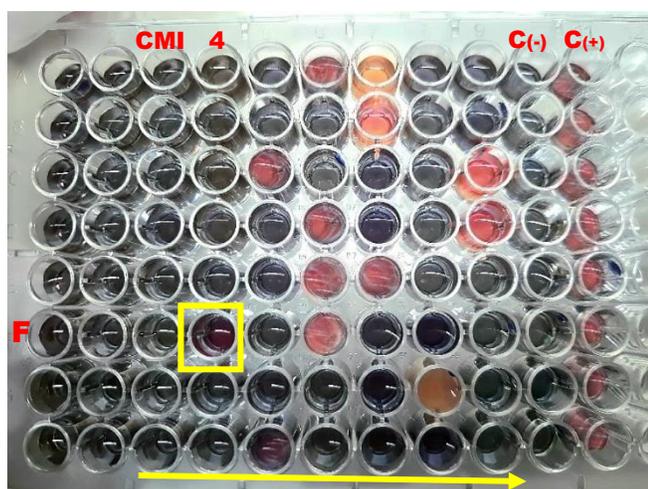


Figura N° 9. Ensayo de concentración mínima inhibitoria de antibiótico claritromicina frente a *Helicobacter pylori*.

En el estudio realizado por Nostro *et al* ⁽⁴⁵⁾, se determinaron las concentraciones inhibitorias mínimas (CMI) de extractos acuosos y etanólicos del propóleo sobre

12 cepas de *H. pylori*, obteniendo CMI que fluctuaron entre 75 y 300 µg/mL con el extracto etanólico y 600–2,500 µg/mL con el extracto acuoso. Reportando CMI menores en comparación a la obtenida en este estudio (CMI:23,810 µg/mL). Los extractos etanólicos presentaron mayor actividad inhibitoria que los extractos acuosos, probablemente porque el alcohol solubiliza concentraciones más altas de compuestos bioactivos como los polifenoles.

Así mismo, Núñez y Umazor ⁽²¹⁾, reportaron concentraciones mínimas inhibitorias del EHP de Chilanga para cada cepa en estudio. En el caso de *Escherichia coli* y *Salmonella enterica serovar Typhimurium*, obtuvieron valores de CMI de 1,326.276 µg/mL y para *Pseudomonas aeruginosa*, un valor de 884.180 µg/mL; siendo estas CMI más bajas en comparación al resultado obtenido en este estudio (CMI:23,810 µg/mL). Es de tener en cuenta que las muestras de propóleo fueron recolectadas de la misma zona geográfica del país y puestas a prueba frente a especies Gram negativas; sin embargo, por el tiempo de almacenaje de las muestras y el tipo de bacteria que es el *H. pylori*, se requiere una concentración mínima inhibitoria, mayor. Del mismo modo, al comparar el resultado del presente estudio con el obtenido por Nostro *et al* ⁽⁴⁵⁾, la CMI es mucho mayor, por ende, el origen, la composición del propóleo y la cepa en estudio podrían ser las implicadas en esta diferencia.

Wang, ⁽⁴⁶⁾ hace referencia a una clasificación de la actividad antimicrobiana de extractos de plantas según el valor de CMI obtenido, en donde se determina como 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 y actividad débil CMI >1000 µg/mL. A causa de lo antes dicho, la CMI obtenida en este estudio se clasifica de actividad débil, dado el valor de 23,810 µg/mL.

Por otra parte, en Álvarez *et al* ⁽⁴⁰⁾, realizaron un estudio *in vitro* de 88 cepas de *H. pylori*. En el determinaron la resistencia a Claritromicina y otros antibióticos; 2 de las 88 cepas fueron resistentes a Claritromicina, y presentaron valores de CMI

de 16,000 y 32,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Al comparar dicho resultado con la CMI obtenida de 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$, del presente estudio, esta es menor y además es sensible a la cepa en estudio. Igualmente, Martínez *et al* ⁽³⁹⁾, realizaron una investigación bibliográfica de resistencia antibiótica de *H. pylori*, frente antibióticos utilizados en la terapia erradicadora, como resultado, recopilaron valores de CMI para Claritromicina entre 16 a 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Teniendo un resultado un poco similar en comparación con el valor obtenido de CMI del presente estudio.

5.3 Evaluación de la actividad antibiótica del extracto hidroalcohólico de propóleo frente a *Helicobacter pylori* NCTC 11637, utilizando la técnica de Tablero de ajedrez.

Esta prueba se realizó con la muestra del extracto hidroalcohólico de propóleo procedente del municipio de Chilanga Morazán, departamento de La Unión y el antibiótico claritromicina.

En la placa de 96 pocillos se observó crecimiento solamente en un pocillo (3 B) y en los controles positivos de crecimiento con una leve coloración rosada. Por tanto, no fue posible construir un gráfico de isoblograma (ver Figura N°10). Se tomó como CMI, la mezcla de extracto de propóleo y de claritromicina contenido en el pocillo 4 B en donde se inhibió el crecimiento de *Helicobacter pylori* a las concentraciones de 2,834.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente y se determinó el índice de FIC con un valor de 1.99, el cual indica un efecto de indiferencia (Ver Anexo N°8). En la Figura N°10 el cuadro de color amarillo el crecimiento bacteriano en el pocillo 3B, observándose una coloración levemente rosada, en el pocillo 4B señalado por una flecha color rojo indica la concentración mínima inhibitoria fraccional seleccionada de la mezcla de extracto de hidroalcohólico de propóleo y de claritromicina.

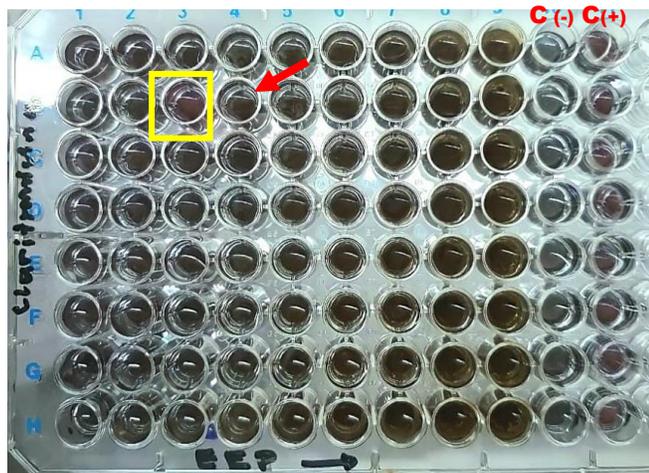


Figura N° 10. Efecto antibiótico usando la técnica de tablero de ajedrez. Mezcla de EHP y claritromicina frente a *Helicobacter pylori*.

Núñez y Umanzor ⁽²¹⁾, reportaron resultados del estudio del efecto antibiótico del propóleo recolectado de la misma zona geográfica de Morazán que la muestra en estudio. Ellos, combinaron la muestra de propóleo con el antibiótico ciprofloxacina contra bacterias Gram negativas teniendo como resultado una CMI fraccional de la mezcla de extracto hidroalcohólico de propóleo y ciprofloxacina para *Escherichia coli*, a las concentraciones 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 propóleo y ciprofloxacina respectivamente.

El coeficiente fraccional inhibitorio para la cepa *Escherichia coli*, fue de 0.377 y para la cepa de *Pseudomonas aeruginosa* fue de 0.375, presentando ambas cepas una interacción sinérgica. Mientras que la cepa de *Salmonella enterica serovar Typhimurium*, cuyo coeficiente fraccional inhibitorio fue de 0.629, resultó con una interacción correspondiente a sumación.

Para determinar el efecto de la interacción entre antimicrobianos se utiliza la siguiente clasificación: sinergismo cuando $\sum CFI \leq 0.5$, adición o sumación > 0.5 $\sum CFI \leq 1$, indiferencia > 1 $\sum CFI \leq 4$ y antagonismo $\sum CFI > 4$. ⁽³⁵⁾

En este estudio se obtuvo un valor de FIC 1.99 (ver Anexo N° 8), demostrando un efecto de indiferencia entre la mezcla de EHP procedente de Chilanga y Claritromicina que se pusieron a prueba, es decir que si estos antimicrobianos son utilizados de forma individual a las concentraciones de 2,834.5 $\mu\text{g/mL}$ y 30 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente se podrá obtener evidencia de la actividad antimicrobiana frente a *H. Pylori*, ya que la presencia de uno frente al otro no va a potenciar o disminuir su efecto antimicrobiano. Pero es de destacar que según el resultado del índice de FIC, en este caso se determina que el antibiótico claritromicina es el responsable de la acción antimicrobiana observada ya que se utiliza para este ensayo una concentración que es más alta que su CMI (16 $\mu\text{g/mL}$).

Romero ⁽³⁸⁾, también realizó un estudio de efecto antibiótico contra la cepa de *H. pylori* ATCC 43504; el combinó el efecto de algunos compuestos fenólicos mayoritarios que fueron extraídos de los propóleos chilenos y determinó que solamente la interacción de crisina/pinocebrina mostro un efecto de sinergismo en comparación con las demás mezclas de compuestos fenólicos que se pusieron a prueba. Por tanto, basándonos en el estudio realizado por Méndez ⁽⁸⁾ en el cual demostró que el propóleo perteneciente a la zona geográfica de Chilanga, Morazán presentó en su composición flavonoides; a su vez, Romero ⁽³⁸⁾ ha demostrado el efecto antimicrobiano y la interacción que tienen entre sí, este tipo de flavonoides, por tanto, podemos argumentar que son los responsables de la actividad antimicrobiana que se ha observado en este estudio. Sin embargo, hay que tener en cuenta que los requerimientos estructurales para la actividad antibacteriana aún no han sido bien definidos, no obstante, hay un acuerdo de que, en la estructura química de estos metabolitos secundarios, al menos debe

estar presente un grupo OH. Para compuestos fenólicos con una alta lipofilidad, mientras mayor sea su número de grupos hidroxilos, resultarán más eficientes desacopladores, ya que, podrían transferir más protones por molécula. Dado que las bacterias no poseen mitocondrias, este mismo mecanismo es el que podría estar operando en la actividad antibacteriana ejercida por los flavonoides, pero a nivel de membrana citoplasmática. (47)

5.4 Resultados de la evaluación de cinética de muerte de *Helicobacter pylori* NCTC 11637.

Esta prueba se realizó utilizando la mezcla de extracto hidroalcohólico de propóleo procedente de Chilanga y de Claritromicina, en donde se inhibió el crecimiento de *Helicobacter pylori* a las concentraciones: 2,834.5 µg/mL y 30 µg/mL, respectivamente. Se realizó la mezcla y se muestreo a los tiempos de 0h, 2h, 4h, 8h, 10h, 24h, 26h, 30h.

Con la mezcla de EHP y Claritromicina se evidenció una reducción logarítmica con respecto al crecimiento inicial (ver Figura N°11), teniendo un efecto letal. Para el control positivo se sembró alícuotas de la solución estandarizada de *Helicobacter pylori* NCTC 11637, a la concentración de 1×10^8 UFC/mL.

Tabla N° 3. Resultados obtenidos de Cinética de muerte de *Helicobacter pylori*.

	Tiempo	Reducción de Log	Concentración
<i>H. Pilory</i> (+)	24h	1.98	---
EHP+Clarithromicina	2h	6.44	2,834.5 µg/mL y 30 µg/mL respectivamente

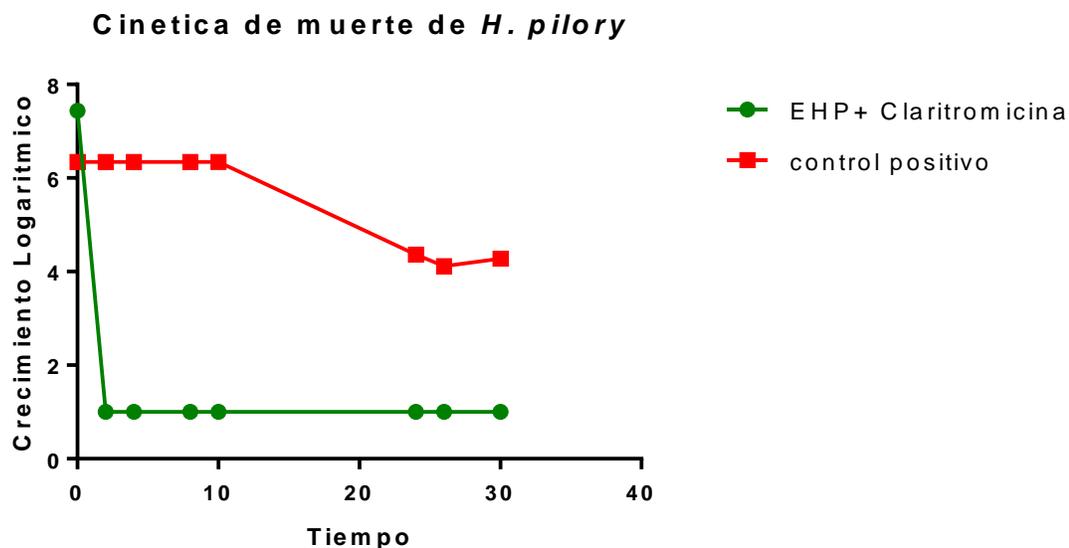


Figura N° 11. Determinación de la muerte bacteriana de la cepa de *H. pylori* NCTC 11637 frente al extracto hidroalcohólico de propóleo de la región de Chilanga, Morazán.

Para la interpretación del ensayo de cinética de muerte, se utilizó el criterio de Pearson *et al*,⁽⁴⁸⁾ que determina muerte microbiana por reducción de tres logaritmos.

En la Figura N° 11 se muestra el comportamiento de la cepa de *H. pylori* frente a la combinación del EHP de Chilanga, Morazán y el antibiótico Claritromicina, en la cual se logra demostrar que, a las 2 horas se obtuvo 6.44 de reducción logarítmica; individualmente el *H. pylori* se utilizó como control de crecimiento y presentó a las 24 horas una reducción logarítmica de 1.98 sobre el recuento inicial. Por lo tanto, la muerte bacteriana de *H. pylori* es evidente empleando la mezcla de Claritromicina y EHP a las concentraciones de 30 µg/mL y 2,834.5 µg/mL respectivamente, ya que se demostró una reducción del crecimiento bacteriano dentro de un periodo corto de 2 horas. Núñez y Umanzor⁽²¹⁾, reportaron

un efecto letal del propóleo proveniente de la misma zona geográfica contra bacterias Gram negativas diferentes a *H. pylori* y el antibiótico Ciprofloxacina. Dentro de sus resultados demostraron muerte bacteriana las siguientes: *Escherichia coli*, *Salmonella enterica serovar Typhimurium* y *Pseudomonas aeruginosa*. Por lo tanto, en ese estudio de cinética de muerte realizado por Núñez y Umazor, los tiempos que reflejaron una reducción logarítmica son mayores comparados a los del presente estudio, sin embargo, las concentraciones del antibiótico Ciprofloxacina y EHP son menores comparadas a las concentraciones utilizadas de Claritromicina y EHP frente al *H. pylori*. En cuanto a la comparación de ambos estudios se puede mencionar que la alta concentración utilizada frente a *H. pylori* y su reducción logarítmica en el corto tiempo de dos horas, refleja una innegable proporcionalidad entre la concentración de la mezcla (antibiótico + EHP) y la reducción logarítmica para las bacterias Gram negativas.

En un estudio *in vitro* realizado por Flamm *et al* ⁽⁴⁹⁾, se evaluaron diferentes antibióticos contra seis cepas de *H. pylori*, dentro de los cuales figuraba como principal la Claritromicina. A 0,12 µg/mL (8xCIM) y un pH que variaba 7.3 a 8.0, este antibiótico mostró una temprana actividad bactericida, la cual fue exhibida por una reducción logarítmica de 3 dentro de las 2-8 horas de exposición. Las horas de inhibición variaban de acuerdo con las condiciones de pH expuestas contra la bacteria, ya que dicho antibiótico mostro ser menos efectivo a medida disminuía el pH. Es de mencionar que en la presente investigación no se tomó en cuenta el pH, por lo tanto, podría ser este un factor muy importante a tomar en cuenta para próximas investigaciones, contra el *H. pylori* debido a que este posee características microbiológicas distintivas que le hacen poseer de una, constante detección, y respuesta a los gradientes de pH, lo cual, es, crítico, para, su supervivencia. Además, se tomó a bien mencionar el estudio anterior debido a que refleja la curva de muerte provocada por la Claritromicina sobre el *H. pylori*, ya que no se logró experimentar individualmente. Dado que en el ensayo del

tablero de ajedrez se obtuvo un efecto de indiferencia entre el antibiótico y el EHP, se podría hacer mención que, a 30 µg/mL se obtuvo una reducción bacteriana en 2 horas, al comparar este dato con el resultado obtenido por Flamm *et al* ⁽⁴⁹⁾, el efecto antibacteriano en el presente estudio se ve reducido ya que la concentración utilizada es mayor y el tiempo de muerte bacteriana es similar. Por lo tanto, la diferencia radica en el uso de una cepa diferente de estudio, posiblemente el pH de la solución de prueba, y la posible resistencia adquirida por *H. pylori* a lo largo de los años.

En cuanto al extracto hidroalcohólico del propóleo, como ya se ha mencionado anteriormente según Méndez ⁽⁸⁾, el propóleo procedente de Chilanga cuenta en su composición con una alta cantidad de flavonoides tipo: chalcona, flavona, flavanona y flavonoles. Específicamente el metabolito kukulcanin A, de tipo trans chalcona y quercetina, del tipo flavonoles. De este último existe el estudio previo realizado por Xiao *et al* ⁽⁵⁰⁾, en el cual se demostró que la quercetina aislada posee una potente actividad inhibidora sobre la ureasa del *H. pylori*, debido a los grupos 3-OH, 5-OH y 3',4'-dihidroxilo en su estructura, los cuales son claves para ejercer la actividad. Dicho esto, podría ser de suma importancia mencionar el estudio realizado por Baltas *et al* ⁽⁵¹⁾ en el cual los extractos de propóleo inhibieron la ureasa de *H. pylori* con un amplio rango de inhibición debido a la quercetina presente en su composición. Estos datos reflejan que si se inhibe la enzima ureasa se inhibe a la bacteria *H. pylori*, ya que en pocas palabras es la que protege y hace sobrevivir a este patógeno en pH bajos. La quercetina podría desempeñar un papel importante, ya que se encuentra presente en la muestra del EHP utilizada; sin embargo, no se sabe su concentración, si ejerce su acción individualmente o si actúa sinérgicamente junto a los demás flavonoides presentes.

Los componentes flavónicos del propóleo poseen diferentes estudios que demuestran su actividad antimicrobiana debido a su estructura. Estos actúan a

través de la membrana e inhiben la motilidad bacteriana, es por ello que el tipo de bacteria en estudio podría variar la concentración de EHP capaz de inhibir. Existen estudios que demuestran mayor actividad inhibitoria sobre las bacterias Gram positivas, que, contra las Gram negativas, esto puede deberse a las diferentes estructuras de las paredes celulares de ambos tipos de bacteria. La concentración utilizada del extracto hidroalcohólico del propóleo contra el *H. pylori* es mayor comparada a las utilizadas en otros estudios nacionales que utilizaron la misma muestra de propóleo, pero contra otras bacterias; esto puede estar relacionado por ser una bacteria móvil resistente a diferentes tratamientos y aún más porque posee características microbiológicas distintivas.

También Figueroa y Beltrán ⁽³⁶⁾ demuestran que los propóleos de El Salvador presentan una variedad de metabolitos secundarios y características organolépticas a las cuales pueden estar ligadas sus propiedades biológicas, siendo probablemente los flavonoides los responsables de la actividad antimicrobiana y de la pérdida de morfología característica microbiana.

Sin embargo, según el análisis de los resultados obtenidos en esta investigación acerca de la actividad biológica de los propóleos salvadoreños frente a *Helicobacter pylori* se determina que no es recomendable usar el extracto hidroalcohólico solo, ya que, requiere de altas concentraciones para presentar actividad, lo cual no favorece su potencial uso como adyuvante al tratamiento farmacológico para erradicar esta bacteria patógena.

**CAPITULO VI
CONCLUSIONES**

6.0 CONCLUSIONES

1. De los tres extractos hidroalcohólicos de propóleos evaluados, solo el procedente del municipio de Chilanga, departamento de Morazán presentó actividad antimicrobiana débil frente a *H. pylori* NCTC 11637. Además, al ser combinado este extracto con el antibiótico claritromicina, se reflejó un efecto de indiferencia, en donde no se observó sinergismo o mejora de la actividad antimicrobiana de la mezcla de antibióticos.
2. En el ensayo de difusión en agar, el extracto hidroalcohólico de propóleo del municipio de Chilanga, departamento de Morazán posee actividad antimicrobiana frente a *Helicobacter pylori* NCTC 11637 y que la misma presenta susceptibilidad en presencia de claritromicina.
3. La concentración mínima inhibitoria reportada del extracto hidroalcohólico del propóleo de Chilanga, Morazán, frente al crecimiento de la cepa *Helicobacter pylori* NCTC 11637, mostró actividad inhibitoria débil.
4. De acuerdo a investigaciones previamente realizadas con los propóleos ensayados, el *Helicobacter pylori* NCTC 11637 presenta una mayor resistencia al extracto hidroalcohólico de propóleo comparada a bacterias como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella entérica serovar typhimurium*.
5. Según la técnica del tablero de ajedrez, el índice de FIC revela una interacción del tipo indiferencia, el cual sugiere que el efecto combinado del extracto hidroalcohólico de propóleo y Claritromicina es indiferente a la actividad del agente de mayor actividad cuando se ponen a prueba de forma individual.

6. En la cinética de muerte; de acuerdo con la reducción logarítmica se comprobó que la cepa de *H. pylori* NCTC 11637 presentó muerte microbiana eficaz con la mezcla de extracto hidroalcohólico de propóleo y claritromicina, a las concentraciones: 2,834.5 µg/mL y 30 µg/mL respectivamente

CAPITULO VII
RECOMENDACIONES

7.0 RECOMENDACIONES

1. Tomar en cuenta para futuras investigaciones la preparación del cultivo de *Helicobacter pylori* NCTC 11637 en agar Columbia, enriquecido con sangre desfibrinada de carnero en un porcentaje mayor al 7% y suplemento Dent arriba del 1.5%, de esa manera se obtendrá un óptimo crecimiento del microorganismo.
2. Continuar con estudios del propóleo procedente de Chilanga, y evidenciar a través de la microscopía electrónica de barrido y de transmisión, la interacción de dicho propóleo y el antibiótico en estudio, el cambio que sucede en la morfología bacteriana normal de las cepas a estudiar.
3. Mantener al *Helicobacter pylori* NCTC 11637, a una temperatura de -80°C, y al realizar el cultivo se debe de extender el tiempo de incubación a cinco días. Si se pretende sembrar de una placa a otra, es necesario incubar solamente 72 horas, ya que la bacteria corre el riesgo de morir debido a que requiere de condiciones de incubación específicas y complejas.
4. Continuar investigaciones, tanto microbiológicas como farmacológicas, para aproximarse a una posible utilidad clínica, utilizando los datos obtenidos *in vitro* del presente estudio, los cuales muestran la actividad anti *H. pylori* del propóleo procedente de Chilanga, Morazán. Asimismo, sería beneficioso comprobar si la actividad antimicrobiana se debe al sinergismo dado por la variabilidad de flavonoides presentes en su composición, o si se ejerce actividad de forma aislada.
5. Ya que existen estudios nacionales sobre las características fisicoquímicas y respectivo perfil cromatográfico del propóleo de Chilanga, Morazán, es conveniente investigar los posibles metabolitos secundarios capaces de ejercer la actividad antimicrobiana y de cierta manera

confirmar si estos actúan en sinergismo o si existe uno en específico con tal acción.

6. Para próximas investigaciones, al realizar el ensayo de cinética de muerte se debe comparar por separado: el antibiótico, el extracto hidroalcohólico del propóleo, el control de crecimiento y la mezcla (antibiótico + EHP) para poder realizar una comparación gráfica adecuada.

BIBLIOGRAFIA

1. Salatino, A; Teixeira, E.W; Negri, G; Message, D. Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2005 Mar;2(1):33-38. doi: 10.1093/ecam/neh060.
2. Rico López, E. Estudio de la actividad antimicrobiana y antioxidante de propóleos de distintos orígenes. Tesis de pregrado. Valencia: Universitat Politècnica de València, Escola Tècnica Superior D'Enginyeria Agronòmica I Del Medi Natural; 2015.
3. Padrón González, A; Naranjo Domínguez, A; Díaz Gallardo, J; Llera Almenteros, R. El propóleo una alternativa de todos los tiempos. *Universidad Médica Pinareña [revista en Internet].* 2012 [citado 5 Ago 2022]; 8 (1) Disponible en: <http://www.revgaleno.sld.cu/index.php/ump/article/view/102>
4. Bellón Leyva, S; Calzadilla Mesa, X.M. Efectividad del uso del propóleo en el tratamiento de la estomatitis aftosa. *Rev Cubana Estomatol [Internet].* 2007 Sep [citado 2022 agosto 05]; 44(3). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75072007000300008&lng=es.
5. Vargas Sánchez, D; Torrescano Urrutia, G.R; Sánchez Escalante A. Los propóleos: conservador potencial para la industria alimentaria. *Interciencia.* 2013 octubre; 38(10): 705–711. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/339/33929482003.pdf>.
6. Garay Rentería, P.D. Caracterización química y actividad biológica de extractos etanólicos de propóleo del estado de Sinaloa. Tesis de postgrado. Sinaloa: Universidad Autónoma de Sinaloa, Facultad de Ciencias Químico Biológicas; 2018.
7. Fabricio, S. Ordoñez, C. Métodos de purificación del propóleos para su posterior aplicación en sanidad animal. Tesis de Ingeniero Zootecnista. Escuela Politécnica de Chimborazo. Riobamba, Ecuador; 2005.

8. Méndez Ramírez, G.R. Evaluación de las características fisicoquímicas y perfil cromatográfico por TLC de propóleos procedentes de cinco localidades de El Salvador. Tesis de licenciatura. San Salvador: Universidad de El Salvador, Facultad de Química y Farmacia; 2020.
9. Arrate, L. Propóleo, el “antibiótico” natural de la colmena. Sustrai: Revista Agropesquera. 2008; 85: 56-61.
10. Municipios de El Salvador. [Online]. [consultado 2021 diciembre 21]. Disponible en: <http://www.municipiosdeelsalvador.com/morazan/chilanga>.
11. Municipios de El Salvador. [Online]. [consultado 2021 diciembre 21]. Disponible en: <https://www.municipiosdeelsalvador.com/la-libertad/huizucar>.
12. Castillo, J. Castillo, M. Hernández, E. Propuesta de fortalecimiento a las iniciativas de micro y pequeñas empresas con potencial turístico a través de un diagnóstico territorial en el municipio de Huizúcar, departamento de La Libertad. Tesis de Licenciatura en administración de empresa. Universidad de El Salvador; 2013.
13. Municipios de El Salvador. [Online]. [consultado 2021 diciembre 21]. Disponible en: <https://www.municipiosdeelsalvador.com/la-union/san-alejo>.
14. Instituto Geográfico Nacional “Ing. Pablo Arnoldo Guzmán”. Scribd. [Online]. [consultado 2021 diciembre 22]. Disponible en: <https://es.scribd.com/document/338899241/Monografia-Del-Departamento-y-Municipios-de-La-Union>.
15. Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales. MARN, Gobierno de El Salvador. [Online].; 2018 [consultado 2021 diciembre 22]. Disponible en: <https://cidoc.marn.gob.sv/documentos/inventario-nacional-de-humedales-el-salvador/>.
16. Linares, J.L. SalvaNATURA. [Online].; 2011 [consultado 2021 diciembre]. Disponible en: http://www.salvanatura.org/wp-content/uploads/2015/08/INVENTARIO-FLORAVASCULAR_PDB_MLQ-

17. Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales. MARN, Gobierno de El Salvador. [Online].; 2015 [consultado 2021 diciembre 22]. Disponible en: <http://rcc.marn.gob.sv/xmlui/handle/123456789/257.2012.pdf>
18. Kubiliene, L; Laugaliene, V; Pavilonis, A; Maruska, A; Majiene, D; Barcauskaite, K; Kubilius, R; Kasparaviciene, G; Savickas, A. Alternative preparation of propolis extracts: comparison of their composition and biological activities. BMC Complement Altern Med. 2015 May 27; 15:156. doi: 10.1186/s12906-015-0677-5.
19. Mayta Tovalino, F; Sacsquispe Contreras, S; Ceccarelli Calle, J; Alania Mallqui, J. Propóleo peruano: Una nueva alternativa terapéutica antimicrobiana en Estomatología. Revista Estomatológica Herediana. 2012 marzo; 22(1).
20. Alves Ferreira Bastos, E.M; Guzmán, D; Figueroa, J; Tello, J; Oliveira Scoaris, D. Caracterización antimicrobiana y físico-química de propóleos de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae) de la Región Andina Colombiana. Acta biol. Colomb. 2011 abril; 16(1).
21. Núñez Flamenco, J.I; Umanzor Echeverría, A.G. Estudio del efecto antibiótico de un extracto de propóleos y ciprofloxacina contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella enterica serovar Typhimurium*. Tesis de licenciatura. Universidad de El Salvador, Facultad de Química y Farmacia; 2020.
22. Cañas Vargas, E.D; Díaz Ortiz, F. Aislamiento e identificación de *Helicobacter pylori* a partir de biopsias gástricas y su respuesta a la terapia antimicrobiana. Tesis de licenciatura. San Salvador: Universidad de El Salvador, Facultad de Química y Farmacia; 2020.
23. Bayona Rojas, M.A. Condiciones microbiológicas para el cultivo de *Helicobacter pylori* Revista Colombiana de Gastroenterología. 2013 junio; 28(2): 94-99.
24. Suárez Guerrero, J.L; Reyes Vera, G.C; Herreros Rosas, L. del M. *Helicobacter pylori*: revisión de los aspectos fisiológicos y patológicos. Medicas UIS. 2011 diciembre; 24(3):275-282.

25. Campos Sánchez, I.A; Huerta López, B.M; Torres Morales, CdC. Comportamiento clínico y epidemiológico del *Helicobacter pylori* en pacientes de consulta externa de medicina interna del Hospital Regional Santiago de Jinotepe, enero a junio 2018. Tesis doctoral. Managua: Universidad Autónoma de Nicaragua, Managua, Facultad Regional Multidisciplinaria de Carazo; 2018.
26. Otero, R; Gómez, Z; Otero, P. L; Trespacios, R. A. *Helicobacter pylori*: ¿cómo se trata en el 2018? Rev. gastroenterol. 2018 enero; 38(1).
27. Granados Benítez, I.R; Granados Flores, N.A; Hernández Velásquez, D.A. Prevalencia y manejo de dispepsia y correlación con la infección por *Helicobacter pilory* en unidades comunitarias de salud familiar El platanar, San Francisco Javier y Barrio Lourdes, enero- junio 2014. Tesis doctoral. San Salvador: Universidad de El Salvador, Facultad de Medicina; 2014.
28. Otero Regino W. La importancia de cultivar *Helicobacter pylori*. Rev Col Gastroenterol. 2013 junio; 28(2): 87-92.
29. Cervantes García, E. Diagnóstico y tratamiento de infecciones causadas por *Helicobacter pylori*. Rev Latinoam Patol Clin Med Lab. 2016 noviembre; 63(4):179-189.
30. Cervantes García, E. *Helicobacter pylori*: mecanismos de patogenicidad. Rev Latinoam Patol Clin Med Lab. 2016 mayo; 63(2):100-109.
31. Avalos García, R; Vanterpool Héctor, M; Morales Díaz, M; Lamoth Wilson, I; Prendes Huerta, A. Nuevos retos en el tratamiento de la infección por *Helicobacter pylori*. Rev. Med. Electrón. 2019 agosto; 41(4).
32. Rodríguez Montero F. Cáncer gástrico: su relación con *Helicobacter pylori*. Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica. 2014; 71(609): 5-7.
33. Gisbert Javier, P. Linfoma gástrico MALT. Rev. esp. enferm. dig. 2013 jun; 105(5): 303-303.

34. Vásquez Pertejo, M. T. Manual MSD versión para profesionales. Pruebas de sensibilidad antimicrobiana o Antibiogramas; 2020 junio. [consultado 2021 diciembre 20]. Disponible en:
<https://www.msdmanuals.com/es/professional/enfermedades-infecciosas/diagn%C3%B3stico-de-laboratorio-de-las-enfermedades-infecciosas/pruebas-de-sensibilidad-o-antibiogramas>
35. Pillai, S.K., Moellering, R.C. and Eliopoulos, G.M. (2005) Antimicrobial Combinations. In: Lorian, V., Ed., Antibiotics in Laboratory Medicine, 5th Edition, the Lippincott Williams & Wilkins Co., Philadelphia, 2005.
36. Beltrán Herrera, E. A; Figueroa Deras, M. N. Evaluación de la actividad antimicrobiana in vitro de extractos de propóleos de diferentes zonas de El Salvador; 2021.
37. Becker, J. M., Caldwell, G. A., & Zachgo, E. A. (1999). Biotecnología: curso de prácticas de laboratorio.
38. Romero Rivera, M.H. Interacciones entre compuestos mayoritarios anti-*Helicobacter pylori* presentes en propóleos de la región del Biobío. Tesis de postgrado. Concepción: Universidad de Concepción, Facultad de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Biológicas-Programa de Magíster en Ciencia. 2017.
39. Martínez, J.D; Henao, S.C; Lizarazo, J. I. Resistencia antibiótica del *Helicobacter pylori* en América Latina y el Caribe. Rev Col Gastroenterol. 2014 sept; 29(3):218-227.
40. Álvarez, A; Moncayo, J.I; Santacruz, J.J; Corredor, L.F; Reinoso, E; Martínez, J.W; et al. Resistencia a metronidazol y claritromicina en aislamientos de *Helicobacter pylori* de pacientes dispépticos en Colombia. Rev. méd. Chile. 2009 oct;137(10): 1309-1314.
41. Cogo, L. L., Monteiro, C. L. B., Miguel, M. D., Miguel, O. G., Cunico, M. M., Ribeiro, M. L., Costa, L. M. D. Anti-*Helicobacter pylori* activity of plant extracts traditionally used for the treatment of gastrointestinal disorders. Brazilian Journal of Microbiology, 41(2), 304–309. 2010. doi:10.1590/s1517-83822010000200007.

42. Villanueva, M; Gonzalez, M; Fernandez, H; Wilson, M; Manquián, N; Otth, C; et al. Actividad Antibacteriana in vitro de Propóleos Chilenos sobre *Helicobacter pylori*. Valdivia: Universidad Austral de Chile, Facultad de medicina, Instituto de Microbiología Clínica; 2015.
43. Reyes Jurado, F; Palou, E; López Malo, A. Métodos de evaluación de la actividad antimicrobiana y de determinación de los componentes químicos de los aceites esenciales. Programa de Doctorado en Ingeniería en Alimentos. Universidad de las Américas Puebla, Departamento de Ingeniería Química, Alimentos y Ambiental; 2014.
44. Boyanova L, Gergova G, Nikolov R, Derejian S, Lazarova E, Katsarov N, et al. Activity of Bulgarian propolis against 94 *Helicobacter pylori* strains in vitro by agar-well diffusion, agar dilution and disc diffusion methods. J Med Microbiol 2005; 54: 481-3. doi: 10.1099/jmm.0.45880-0.
45. Nostro, A; Cellini, L; Di Bartolomeo, S; Di Campi, E; Grande, R; Cannatelli, M.A; Marzio, L; Alonzo, V. Antibacterial effect of plant extracts against *Helicobacter pylori*. Phytother Res. 2005 Mar;19(3):198-202. doi: 10.1002/ptr.1640.
46. Wang, Y.C. Medicinal plant activity on *Helicobacter pylori* related diseases. World J Gastroenterol. 2014 Aug 14;20(30): 10368-82. doi:10.3748/wjg.v20.i30.10368.
47. Modak, B; Arrieta, A; Torres, R. & Urzua, A. Actividad antibacteriana de flavonoides aislados del exudado resinoso de *Heliotropium sinuatum*: efecto del tipo de estructura. Boletín de Sociedad Chilena de Química. 2012 marzo; Vol. 47(N°1): 19-23
48. Pearson, R.D; Steigbigel, R.T; Davis, H.T; Chapman, S.W. Method of reliable determination of minimal lethal antibiotic concentrations. Antimicrob Agents Chemother. 1980 nov; 18(5): p. 699–708.
49. Flamm, R.K; Beyer, J; Tanaka, S.K; Clement, J. Kill kinetics of antimicrobial agents against *Helicobacter pylori*. J Antimicrob Chemother. 1996 oct; 38(4): p. 719-725.

50. Xiao, Z.P; Wang, X.D; Peng, Z.Y; Huang, S; Yang, P; Li, Q.S; Zhou, L.H; Hu, X.J; Wu, L.J; Zhou, Y; Zhu, H.L. Molecular docking, kinetics study, and structure-activity relationship analysis of quercetin and its analogous as *Helicobacter pylori* urease inhibitors. J Agric Food Chem. 2012 oct 24;60(42):10572-7. doi: 10.1021/jf303393n.
51. Baltas, N; Karaoglu, S.A; Tarakci, C; Kolayli, S. Effect of propolis in gastric disorders: inhibition studies on the growth of *Helicobacter pylori* and production of its urease. J Enzyme Inhib Med Chem. 2016;31(sup2):46-50. doi: 10.1080/14756366.2016.1186023.

ANEXOS

ANEXO N°1

COMPUESTOS MAYORITARIOS DEL PROPÓLEO PROCEDENTE DE CHILANGA, DEPARTAMENTO DE MORAZAN, EL SALVADOR.

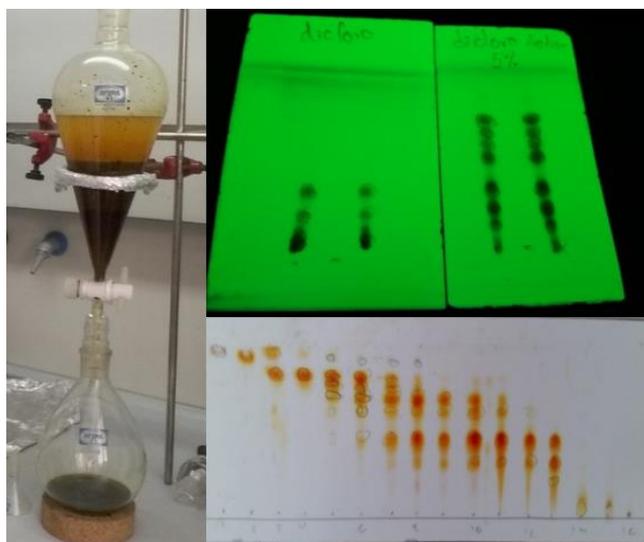


Figura N°12. Separación de metabolitos de los extractos de los propóleos utilizando técnicas cromatográficas.

ANEXO N° 2

ESPECTROS OBTENIDOS DEL PROPÓLEO PROCEDENTE DE CHILANGA, DEPARTAMENTO DE MORAZÁN, EL SALVADOR.

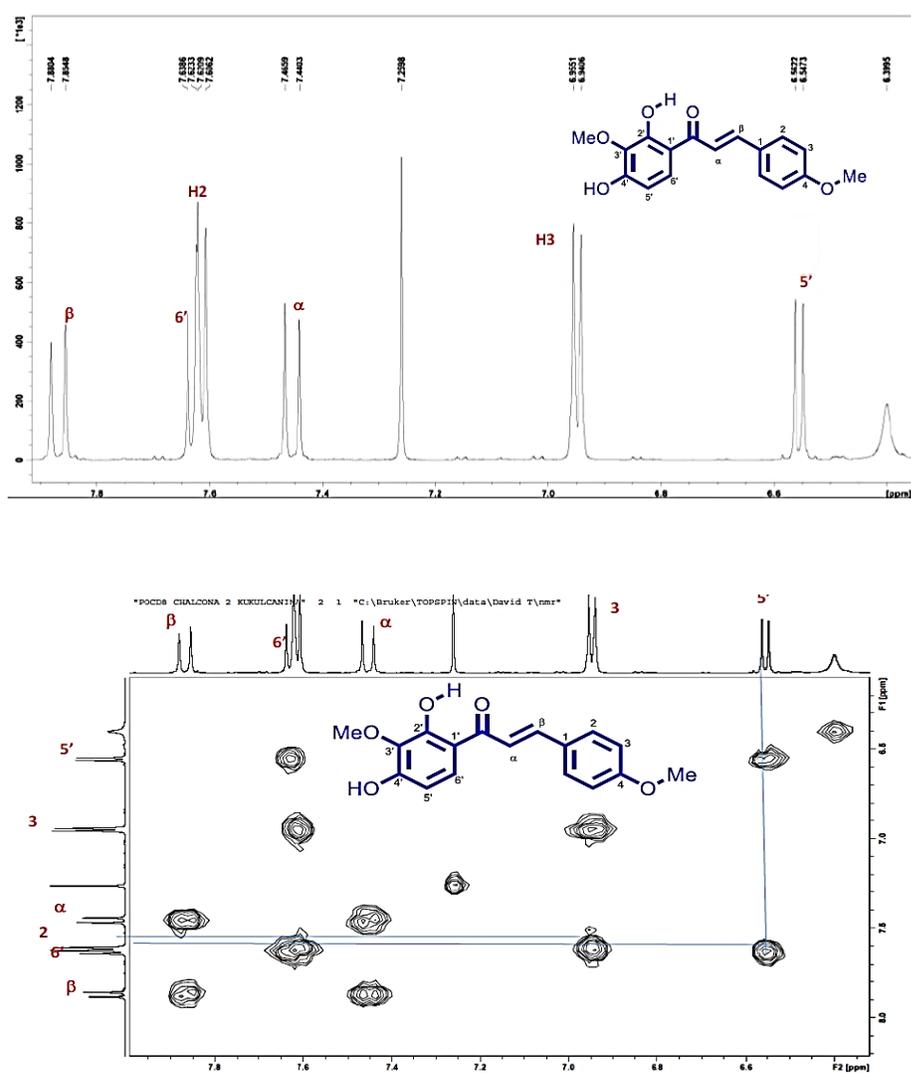


Figura N°13. Espectros obtenidos mediante técnicas RMN, IR y UV de los compuestos mayoritarios y estructura de Kukulcanin A.

ANEXO N°3

MAPA DE EL SALVADOR Y RECOLECCION DE LAS MUESTRAS DE PROPOLEO.



-  Departamento de La Libertad: Huizúcar.
-  Departamento de La Unión: San Alejo
-  Departamento de Morazán: Chilanga.

Figura N°14. Lugares de recolección de muestras de los propóleos.

ANEXO N°4

RECOLECCION Y CONDICIONES DE ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE PROPOLEO.

Tabla N°1. Ubicación de las muestras de propóleo de acuerdo con los municipios de recolección.

Cód.	Municipio de recolección de la muestra	Departamento	Fecha de recolección	Coordenadas geográficas.
1	San Alejo	La Unión	De junio a Julio de 2019	Latitud: 13.5833, Longitud: -89.2333 13° 34' 60" Norte, 89° 13' 60" Oeste
2	Huizúcar	La Libertad	De junio a Julio de 2019	Latitud: 13.4333, Longitud: -87.9667 13° 25' 60" Norte, 87° 58' 0" Oeste
3	Chilanga	Morazán	Mayo de 2019	Latitud: 13.7167, Longitud: -88.1167 13° 43' 0" Norte, 88° 7' 0" Oeste

Tabla N°2. Condiciones de almacenamiento de las muestras de extractos de propóleo en estado liofilizado.

Cod	Temperatura	Aspecto	Color	Material de almacenamiento
1	4 °C a 8°C	Seroso	Café claro	Tubo Falcon de 50 MI
3	4 °C a 8°C	Seroso	Café oscuro	Tubo Falcon de 50 mL
2	4 °C a 8°C	En gránulos	Café oscuro	Frasco Ámbar 50 mL

ANEXO N°5
FOTOGRAFÍAS DE MUESTRAS DE PROPOLEO, SEGÚN ZONA DE
PROCEDENCIA.



Figura N°15. Muestra del extracto hidroalcohólico de propóleo procedente de la zona geográfica de San Alejo, La Unión.



Figura N° 16. Muestra del extracto hidroalcohólico de propóleo procedente de la zona geográfica de Huizúcar, La Libertad.



Figura N°17. Muestra del extracto hidroalcohólico de propóleo procedente de la zona geográfica de Chilanga, Morazán.

ANEXO N°6
LISTA DE MATERIALES, EQUIPOS, 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 100 mL y 25 mL
- Erlenmeyer de 250 mL
- Agitador de vidrio
- Balanza semianalítica
- Probeta de 1000 mL
- Papel glassine
- Perforador
- Micropipeta multicanal
- Puntas para micropipeta de 200 μ L
- Puntas para micropipeta de 1000 μ L
- Bandejas de 96 pocillos
- Beaker de 50 mL
- Frasco lavador
- Tubos falcón
- Tubos ependorff
- Orador
- Hisopos estériles
- Jeringas de 3mL

Equipo

- Agitador Vortex
- Espectrofotómetro UV
- Incubadora de anaerobiosis
- Cabina de flujo laminar
- Microscopio
- Cuenta colonias
- Ultra-Congelador
- Baño maría
- Balanza analítica
- Refrigeradora

Reactivos

- Etanol al 70%
- Metanol
- Dimetilsulfóxido
- Agua Estéril
- Sangre desfibrinada
- Suplemento nutritivo para H. pylori DENT
- Resazurina al 0.01%
- Claritromicina

Medios de Cultivo

- Agar columbia
- Solución Salina Estéril
- Agar Mueller-Hinton
- Caldo BHI
- Caldo mueller-hinton

ANEXO N°7

**ESQUEMAS DE TRABAJO PARA LA REALIZACION DE LOS DIFERENTES
ENSAYOS EXPERIMENTALES.**

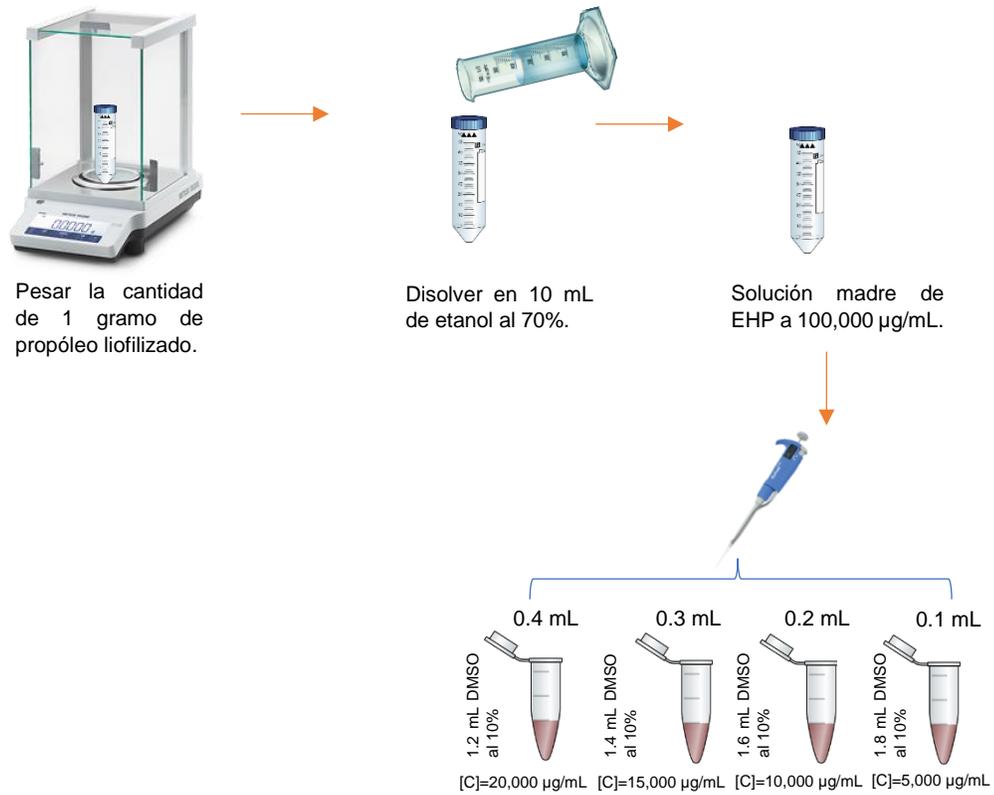


Figura N°18. Esquema de preparación de diluciones del extracto hidroalcohólico de propóleo.

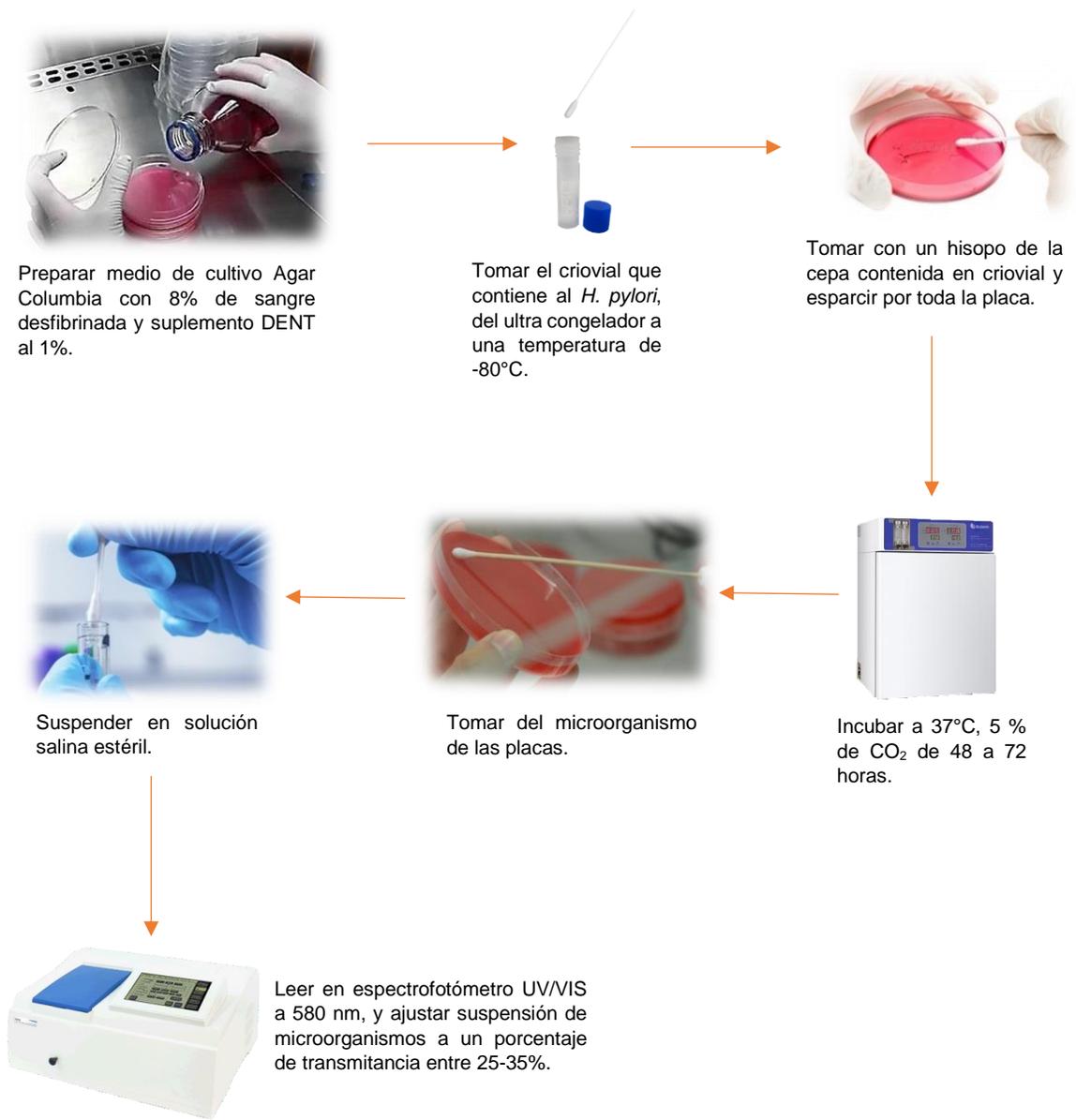


Figura N°19. Procedimiento para el cultivo de la cepa de *Helicobacter pylori* NCTC 11637.



Preparar placas Petri con 20 mL de Agar Müller-Hinton más 5% de sangre desfibrinada y suplemento DENT al 1%.



Realizar los pocillos de 7mm de diámetro en el medio del cultivo, separados aproximadamente 20 mm entre sí, de modo que, se realicen 5 pocillos por placa.



Tomar con un hisopo de algodón estéril, de la suspensión de *H. pylori* previamente estandarizada a 1×10^8 UFC/mL.



Esparcir en el medio cubriendo toda la placa.



Agregar en los pocillos correspondientes 50 μ L de la muestra de EHP a las concentraciones de: 20,000 μ g/mL, 15,000 μ g/mL, 10,000 μ g/mL y 5,000 μ g/mL.



Incubar a 37°C, 5% de CO₂ de 48 a 72 horas.



Realizar la lectura y medir los halos de inhibición con un pie de rey (mm).

Figura N°20. Procedimiento para el método de difusión en Agar.

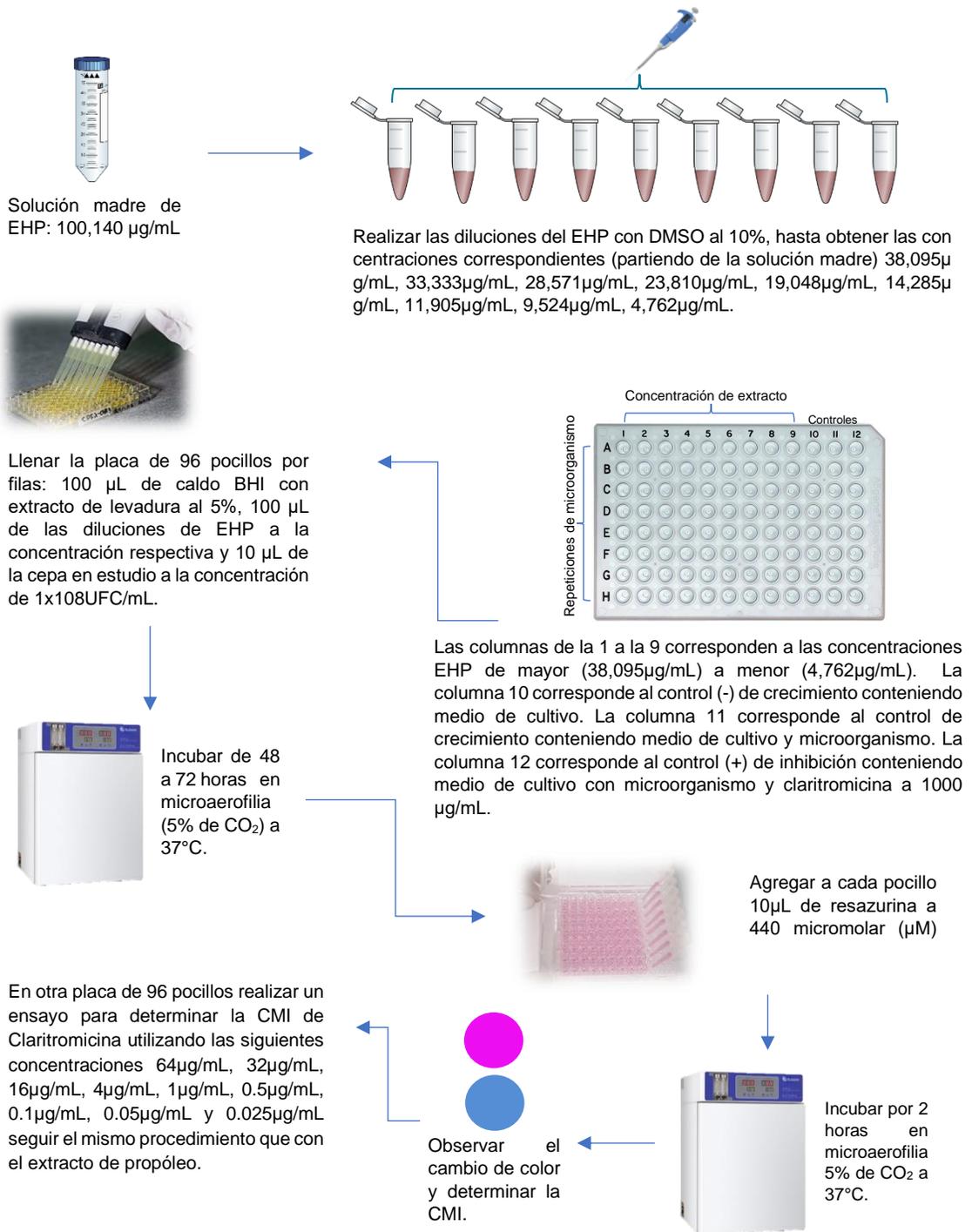


Figura N°21. Procedimiento para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).

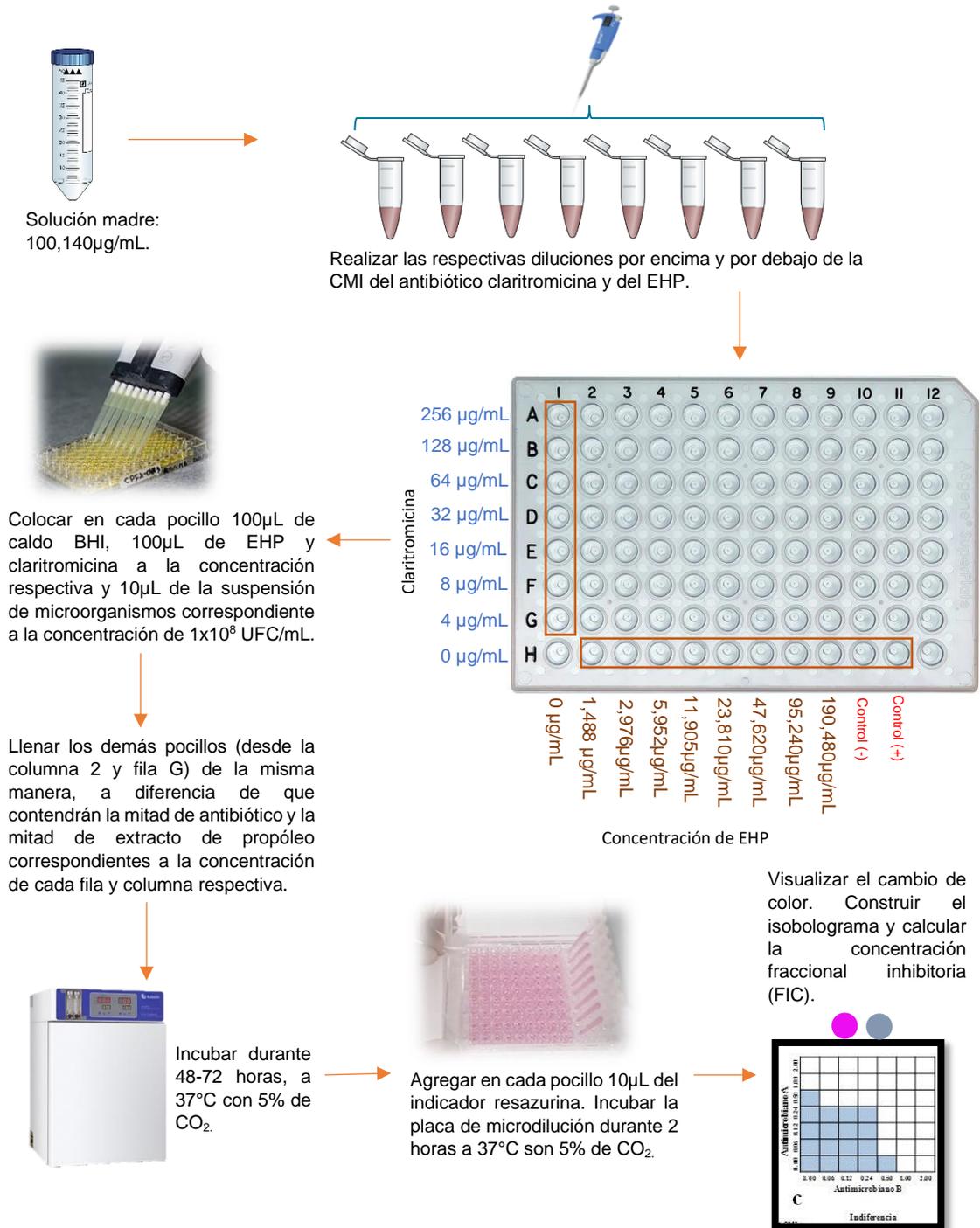


Figura N° 22. Procedimiento para la determinación del efecto antibiótico mediante el método de tablero de ajedrez.

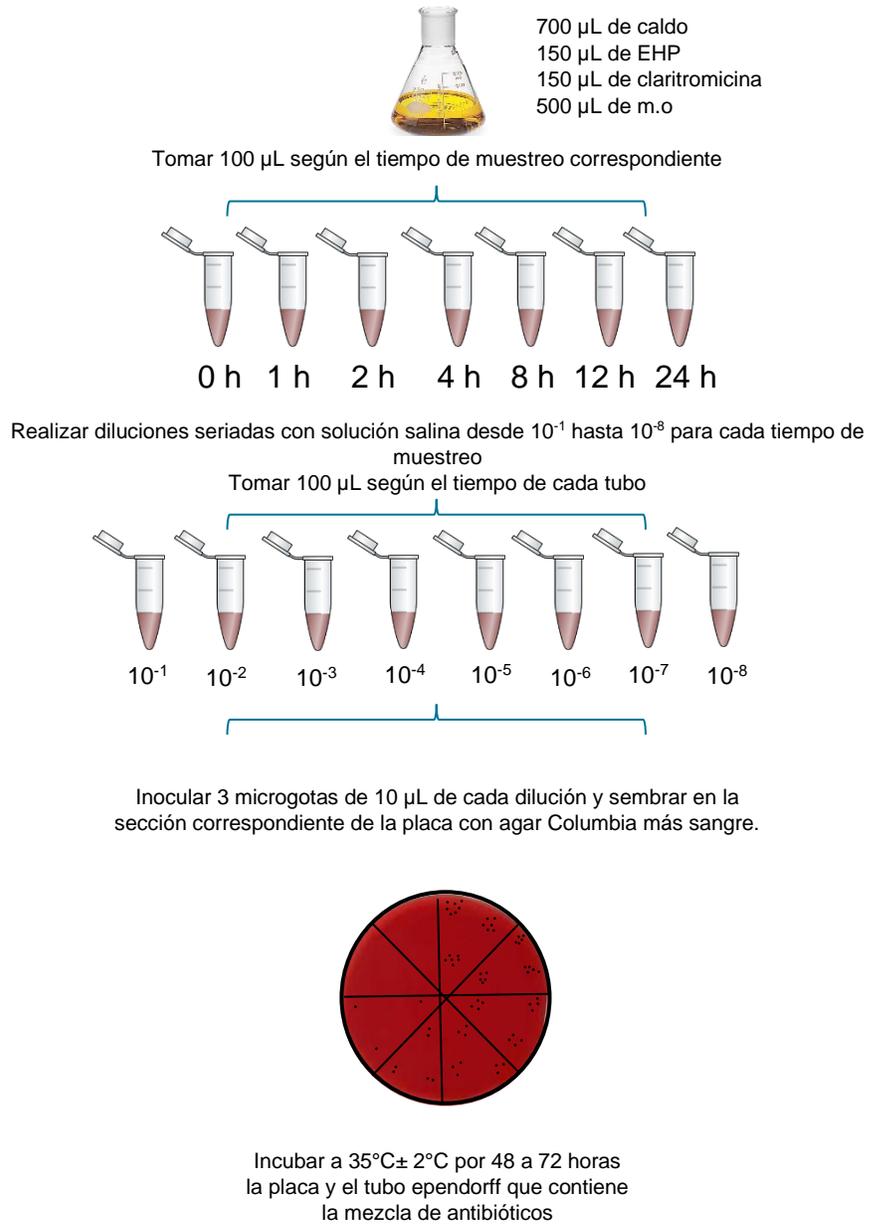


Figura N° 23. Procedimiento para la determinación de cinética de muerte.

ANEXO N° 8

CÁLCULO DEL ÍNDICE FRACCIONAL INHIBITORIO (FIC)

DATOS:

$$A=2,834.5 \mu\text{g/mL}$$

$$B=30.4 \mu\text{g/mL}$$

$$\text{CMI}_A=23,810 \mu\text{g/mL}$$

$$\text{CMI}_B=16 \mu\text{g/mL}$$

$$\frac{(A)}{\text{CMI}_A} + \frac{(B)}{\text{CMI}_B} = \text{FIC}_A + \text{FIC}_B = \text{FIC}_{\text{INDEX}}$$

$$\frac{(2,834.5 \mu\text{g/mL})}{23,810 \mu\text{g/mL}} + \frac{(30.4 \mu\text{g/mL})}{16 \mu\text{g/mL}} = 0.09 + 1.9 = 1.99$$