

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE SANTA MARÍA

FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS, BIOQUÍMICAS Y BIOTECNOLÓGICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA



**“EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIMICROBIANO *in vitro*
DEL *propolis* “PROPÓLEOS” DE TRES REGIONES DEL SUR
DEL PERÚ SOBRE EL CRECIMIENTO DE *Candida albicans*,
Escherichia coli, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa*”**

Tesis presentada por los Bachilleres:

Calla Carbajal, Karing Katherine

Quispe Ticona, Diana Katherin

Para optar el Título Profesional de:

Químico Farmacéutico

Asesor:

Dra. López Valencia Jenny Candelaria

AREQUIPA – PERÚ

2016

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Católica de Santa María por darme la oportunidad de estudiar y ser un profesional.

A la Escuela profesional de Farmacia y Bioquímica por permitirme el uso de sus laboratorios.

A mi asesora de tesis la Dra. Jenny López Valencia, por la orientación y ayuda que me brindo para la realización de esta tesis.

Al Dr. PhD José Villanueva, por sus conocimientos brindados para la realización de esta tesis.

Al Dr. Ricardo Abril, por su apoyo, consejo, por el material y equipo que nos facilitaron.

Al Ing. Chávez por su apoyo y orientación, además de proporcionar el material de investigación.

A todos nuestros profesores de estudios que me enseñaron tanto de la profesión como de la vida, impulsándome a seguir adelante.

A nuestros amigos que apoyaron la realización de este trabajo, gracias Jimmy.

DEDICATORIA

A Dios, por haberme permitido llegar hasta este punto, haberme dado salud para lograr mis objetivos y fuerza para seguir adelante.

A mi madre Victoria, por haberme apoyado en todo momento, por la motivación constante, tu ayuda en los momentos difíciles, gracias por ser mi todo.

A mi padre Eudocio, por los ejemplos de perseverancia y constancia que lo caracterizan y el valor para seguir adelante, gracias por tu amor, por ustedes soy lo que soy.

A mi hermano Jonathan, por ser el gran amigo para mí, ayudándome para poderme realizar, uno de los seres más importantes de mi vida.

Y a ti Lucas, por haber estado siempre conmigo, por brindarme tu ayuda, tu apoyo, las desveladas sirvieron de algo, gracias.

A Dios, por haberme permitido llegar hasta este punto, por darme la oportunidad de vivir y por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente para lograr mis objetivos, además de su infinita bondad y amor.

A mi padre Héctor Yony, por haberme apoyado durante este camino, por ser un ejemplo de perseverancia y constancia, por sus consejos y por su amor incondicional. Papá gracias por darme una carrera para mi futuro, todo esto te lo debo a ti.

A mi madre Andrea Vilma, por darme la vida, quererme mucho, creer en mí, porque siempre me apoyaste incondicionalmente, por sacarme adelante dándome ejemplos de superación y entrega, pero más que nada, por su amor.

A mis hermanos Harold, Héctor y Marjhory por sus palabras, compañía y por ser mi inspiración para ser mejor cada día.

Karing y Diana

“La ciencia es la estética de la inteligencia”

Gastón Bachelard



ÍNDICE

RESUMEN.....	VI
ABSTRACT.....	VIII
INTRODUCCIÓN	X
HIPÓTESIS.....	XII
OBJETIVOS	XIII

CAPITULO I

MARCO TEÓRICO.....	1
1. Aspectos y generalidades de apicultura.....	1
1.1. Apicultura en Perú	2
1.2. Tratamiento, producción y exportación	3
1.3. Productos derivados de la colmena.....	4
2. Propóleos	4
2.1. Historia.....	4
2.2. Definición	5
2.3. Características	7
2.4. Composición	8
2.5. Propiedades farmacológicas	10
3. Extracción.....	12
3.1. Tipos de extractos	13
3.2. Métodos de extracción	14
4. Cromatografía.....	15
4.1. Principios de la cromatografía	16
4.2. Cromatografía en capa fina (TLC).....	17
5. Descripción de los microorganismos en estudio	18
5.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	18
5.2. <i>Escherichia coli</i>	21
5.3. <i>Pseudomona aeruginosa</i>	24
5.4. <i>Candida albicans</i>	27

CAPITULO II

MATERIALES Y MÉTODOS	31
1. Materiales	31
1.1. Material biológico.....	31
1.2. Material de laboratorio.....	31
2. Otros materiales.....	32
3. Reactivos	32
3.1. Reactivos químicos	32
3.2. Medios de cultivo.....	33

4. Equipos.....	33
5. Métodos.....	34
5.1. Procesamiento del material de investigación (propóleos)	34
5.2. Análisis del propóleos.....	34
5.3. Obtención de extractos de propóleos	35
5.4. Estudio preliminar de la actividad antimicrobiana de los extractos de propóleos	37
5.5. Análisis fitoquímico preliminar del extracto de propóleos.....	39
5.6. Identificación de los microorganismos	40
5.7. Evaluación de la actividad antimicrobiana	45
5.8. Análisis estadístico	49

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSIÓN	51
1. Análisis del propóleos	51
1.1. Propiedades organolépticas.....	51
1.2. Determinación de humedad, cenizas y grasas	52
2. Obtención de extractos de propóleos	52
2.1. Determinación del rendimiento de extracción	53
3. Estudio preliminar de la actividad antimicrobiana de los extractos de propóleos	54
3.1. Determinación de la sensibilidad microbiana por el método “hoyo-placa”.....	54
3.2. Determinación de la concentración bactericida o fungicida mínima.....	54
4. Análisis fitoquímico preliminar del extracto de propóleos	55
4.1. Perfil de cromatografía en capa fina.....	55
4.2. Detección de flavonoides.....	56
4.3. Detección de taninos.....	59
4.4. Detección de alcaloides	59
4.5. Detección de terpenos.....	60
5. Identificación de los microorganismos.....	62
5.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	62
5.2. <i>Candida albicans</i>	65
6. Evaluación de la actividad antimicrobiana.....	67
6.1. Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)	68
6.2. Concentración Bactericida o Fungicida Mínima (CBM o CFM)	70
6.3. Sensibilidad antimicrobiana.....	73
CONCLUSIONES	77
SUGERENCIAS	78
BIBLIOGRAFÍA	79
ANEXOS	87

RESUMEN

Los propóleos son mezclas de resinas recogidas por las abejas a partir de plantas, especialmente de flores y brotes de hojas y son llevadas a sus colmenas. Uno de los usos tradicionales de estos productos es para el tratamiento de ciertas infecciones; y dicha propiedad podría deberse a la composición química que presentan.

La evaluación del efecto antimicrobiano de extractos de propóleos provenientes de Arequipa, Cusco y Tacna, se realizó en los laboratorios de la Universidad Católica de Santa María; para lo cual, se realizó un estudio preliminar de la actividad antimicrobiana de extractos de los propóleos con diferentes solventes (etanol, cloroformo y hexano), frente a *Candida albicans*, *Escherichia Coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa*. Seguidamente, se realizó un análisis fitoquímico preliminar, de los extractos, mediante cromatografía en capa fina (CCF). El efecto antimicrobiano de los extractos se evaluó determinándose las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM), concentraciones bactericidas o fungicidas mínimas (CBM o CFM) y la sensibilidad antimicrobiana de diferentes concentraciones de extracto de propóleos (50 – 250mg/mL).

Los propóleos obtenidos de Arequipa, Cusco y Tacna, presentaron características propias de éstos productos (organolépticas, porcentaje de humedad, cenizas y grasas). El proceso de extracción con etanol, tuvo un mayor rendimiento ($61\% \pm 0.63$, $63\% \pm 0.39$ y $57\% \pm 0.05$, para los propóleos de Arequipa, Cusco y Tacna, respectivamente). El análisis fitoquímico preliminar evidenció la presencia de

flavonoides, terpenos y taninos en los extractos etanólicos de los propóleos en estudio. Además, el estudio preliminar de la actividad antimicrobiana de éstos extractos demostró la sensibilidad de *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*, así mismo, la resistencia de *Escherichia Coli* y *Pseudomona aeruginosa*.

Por otro lado, las CIMs de los extractos etanólicos de propóleos de Arequipa, Cusco y Tacna, frente a *Staphylococcus aureus*, fueron 83.0 ± 10.1 ; 64.8 ± 5.1 y 86.4 ± 8.8 mg/mL, respectivamente; mientras que las CBMs fueron 87.5 ± 11.2 ; 68.2 ± 6.5 y 95.5 ± 15.1 mg/mL, para los extractos de propóleos en el mismo orden.

Asimismo, Las CIMs de los extractos etanólicos de propóleos de Arequipa, Cusco y Tacna, frente a *Candida albicans*, fueron 92.0 ± 8.4 ; 70.5 ± 8.4 y 85.2 ± 7.5 mg/mL, respectivamente; mientras que las CFMs fueron 94.3 ± 8.6 ; 89.8 ± 7.5 y 104.5 ± 6.3 mg/mL, para los extractos de propóleos en el mismo orden

Finalmente, se observó que la sensibilidad antimicrobiana de los extractos etanólicos de propóleos estudiados frente a *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*, es dependiente de la concentración del extracto ($p < 0.05$) en el rango de 50-250 mg/mL; además, el extracto de propóleos de Cusco presenta una mayor actividad antimicrobiana.

Se concluye que los extractos etanólicos de propóleos provenientes de Arequipa, Cusco y Tacna, presentan una actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*; además, no muestra actividad antimicrobiana alguna frente a *Escherichia Coli* y *Pseudomona aeruginosa*.

ABSTRACT

Propolis are mixtures of resins collected by bees from plants, especially from flowers and leaf shoots and are carried to their hives. One of the traditional uses of these products is for the treatment of certain infections; and this property could be due to the chemical composition that they present.

The evaluation of the antimicrobial effect of propolis extracts from Arequipa, Cusco and Tacna, was carried out in the Catholic University of Santa Maria laboratories; for which, a preliminary study of the antimicrobial activity of propolis extracts with different solvents (ethanol, chloroform and hexane) against *Candida albicans*, *Escherichia Coli*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomona aeruginosa* was carried out. Subsequently, a preliminary phytochemical analysis of the extracts was performed by thin layer chromatography (TLC). The antimicrobial effect of the extracts was evaluated by determining minimum inhibitory concentrations (MICs), minimum bactericidal or fungicidal concentrations (CBM or CFM) and the antimicrobial sensitivity of different concentrations of propolis extract (50-250mg/mL).

The propolis obtained from Arequipa, Cusco and Tacna, presented specific properties of these products (organoleptic characteristics, percentage humidity, ashes and fats). The extraction process with ethanol had a higher yield ($61\% \pm 0.63$, $63\% \pm 0.39$ and $57\% \pm 0.05$, for the propolis from Arequipa, Cusco and Tacna, respectively).

The preliminary phytochemical analysis evidenced the presence of flavonoids, terpenes and tannins in the ethanolic propolis extracts under study. In addition, the preliminary study of the antimicrobial activity of these extracts demonstrated the sensitivity of *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*, as well as, the resistance of *Escherichia Coli* and *Pseudomona aeruginosa*.

On the other hand, the MICs of the ethanolic propolis extracts from Arequipa, Cusco and Tacna, compared to *Staphylococcus aureus*, were 83.0 ± 10.1 ; 64.8 ± 5.1 and 86.4 ± 8.8 mg/mL, respectively; while the CBMs were 87.5 ± 11.2 ; 68.2 ± 6.5 and 95.5 ± 15.1 mg / mL, for propolis extracts in the same order.

Likewise, the CIMs of ethanolic extracts from Arequipa, Cusco and Tacna, against *Candida albicans*, were 92.0 ± 8.4 ; 70.5 ± 8.4 and 85.2 ± 7.5 mg / mL, respectively; While CFMs were 94.3 ± 8.6 ; 89.8 ± 7.5 and 104.5 ± 6.3 mg / mL, for proplis extracts in the same order

Finally, it was observed that the antimicrobial sensitivity of the ethanolic propolis extracts of studied against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*, is dependent on the extract concentration ($p < 0.05$) in the range of 50-250mg / mL; In addition, the propolis extract from Cusco presents a greater antimicrobial activity.

It is concluded that the ethanolic propolis extracts from Arequipa, Cusco and Tacna, present antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*; Furthermore, it shows no antimicrobial activity against *E. coli* and *Pseudomona aeruginosa*.

INTRODUCCIÓN

Debido al desarrollo y la comercialización en masa de los antibióticos, las bacterias patógenas y no patógenas han desarrollado resistencia a los antibióticos desde el siglo pasado. Debido a ello, su control debe ser priorizado ya que constituye una amenaza para todas las naciones, sin reparar en su territorio y situación económica.¹

Desde tiempos remotos es sabido que las plantas han sido utilizadas para una amplia variedad de propósitos y al hablar de medicina natural nos referimos a aquellos recursos que son sintetizados de forma natural por organismos como las plantas, los animales, los microorganismos, o inclusive los recursos minerales con diferentes propiedades, pero que es sin duda el reino vegetal el que ofrece mayor variedad de sustancias potencialmente útiles en el tratamiento de enfermedades, incluidas las originadas por microorganismos y que a muchas de ellas se las considera como alternativa de prevención de enfermedades infecciosas.

Así, los productos derivados de las plantas pueden representar una estrategia prometedora en muchas enfermedades². Productos que serán utilizadas como materia prima para la utilización de extractos o para el aislamiento de sustancias naturales puras, representando así una gran área en expansión.

Además, en la actualidad se reconoce la importancia de origen natural, por que poseen innumerables características, con bajo costo y sus principios activos están biológicamente equilibrados evitando que se acumulen en el organismo, no presentando efectos secundarios o no advertidos.

Al propóleos se le considera una mezcla de grandes potencialidades para el tratamiento de afecciones provocadas por diferentes microorganismos en seres humanos y animales atribuyéndole propiedades curativas.³ Además, una de las

propiedades más importantes que son atribuidas al propóleo es su actividad antibacteriana, las cuales se le atribuyen fundamentalmente a los flavonoides.

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, se describirá el flujo racional de trabajo sugerido en la búsqueda del efecto antimicrobiano del Extracto Etanólico del Propóleo “EEP” provenientes de los apiarios de tres regiones del Sur del País frente a *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Staphilococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa* y determinar la composición cualitativa de los tres extractos.



HIPÓTESIS

Dado que en la medicina tradicional existen antecedentes del uso del *própolis* “PROPÓLEOS” en enfermedades infecciosas; es probable que el extracto etanólico de *própolis* “PROPÓLEOS” de los apiarios de las tres regiones (Arequipa, Cusco y Tacna) presenten *in vitro*, un efecto antifúngico sobre *Candida albicans*, y un efecto antimicrobiano frente a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa*.

OBJETIVOS

1. Evaluar y comparar la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de propóleos, provenientes de tres regiones (Arequipa, Cusco y Tacna) frente a *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa*.
2. Obtener los extractos etanólicos, clorofórmicos y hexánicos de propóleos por el método de percolación.
3. Realizar un análisis fitoquímico preliminar de los extractos etanólicos de propóleos, mediante cromatografía en capa fina.
4. Determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) y la concentración bactericida o fungicida mínima (CBM o CFM), del extracto etanólico de propóleos frente a los microorganismos en estudio.
5. Determinar la sensibilidad antimicrobiana de los extractos etanólicos de propóleos en diferentes concentraciones (50; 100; 150 y 250mg/mL), frente a los microorganismos en estudio.
6. Comparar la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos de propóleos provenientes de Arequipa, Cusco y Tacna.

CAPÍTULO I



MARCO TEÓRICO

1. Aspectos y generalidades de apicultura

Etimológicamente, el término “Apicultura” proviene del latín “apis” (abeja) y “cultura” (cultivo), es decir, la ciencia que se dedica al cultivo o a la cría de abejas para aprovechar sus productos.⁴

De acuerdo con la historia, en la era del mioceno hace 10 a 12 millones de años, mucho antes de la aparición del hombre, las abejas estaban extendidas en el planeta cuando no había separación entre desiertos y mares como lo es actualmente. En la prehistoria en el neolítico, el hombre ya recolectaba miel. Así en España en la gruta de la Araña en los montes de Valencia se encontró una pintura rupestre que data del 7000 a.C. “Los fósiles atestiguan la existencia de insectos en el planeta en el Período Carbonífero de la era Paleozoica antes de la existencia del hombre. Las abejas, relativamente casi sin cambios han estado presentes por más de 50 millones de años. Por lo tanto no es una sorpresa que su contacto con el hombre sea prehistórico”⁵

La apicultura, comenzó cuando el hombre aprendió a proteger, cuidar y controlar el futuro de las colonias de abejas que encontró en árboles huecos o en otras partes. La evidencia de las primeras colmenas data del año 2500 a.C., su construcción dependía de los materiales que se encontraban a la mano en la zona y de las habilidades de los habitantes de las diferentes comunidades. Las colmenas primitivas cumplieron ciertas funciones necesarias: protegían a las abejas y sus panales del viento, la lluvia y de los calores y fríos extremos; sus piqueras eran suficientemente chicas para ser defendidas por las abejas; existía además alguna otra abertura para uso del apicultor cuando quería sacar la miel y la cera, que constituían su cosecha. Las maderas, corteza de árbol y barro, eran resistentes a la intemperie de por sí y las colmenas de paja y mimbre estaban generalmente protegidas por un techo adicional, empastándolas frecuentemente con barro o estiércol. La abeja melífera, pertenecía al Viejo Mundo a Europa, África y Asia. Antes del año 1500 no existían abejas melíferas en el Nuevo Mundo, en las

Américas, Australia y Nueva Zelanda. Pero, a diferencia del perro, la abeja melífera había acompañado al hombre prácticamente en todas sus migraciones más importantes, y colonizadores, en cada parte del Nuevo Mundo, trajeron con ellos sus colmenas de abejas. “La *Apis mellífera* es el más evolucionado de todos los insectos debido a su comportamiento social y a su alta especialización en sus funciones. Sin embargo, posiblemente la característica más saltante de este insecto sea que para realizar la polinización de plantas y la producción de diversos productos no necesita destruir absolutamente nada, a diferencia de todos los otros insectos benéficos que requieren un gasto en el ecosistema.”⁶

1.1. Apicultura en Perú

La apicultura en el Perú es una de las actividades económicas agropecuarias realizada mayormente por pequeños productores, distribuidos en todas las regiones del país (costa, sierra y selva) y en donde se ha ido extendiendo en casi todos los lugares donde habita el ser humano. En nuestro país la Apicultura es una actividad que ha ido avanzando progresivamente en búsqueda de alternativas y oportunidades para agregar valor a la cadena agroalimentaria. Con un gran potencial en la producción de miel, nuestro país desarrolla una promisorio actividad apícola. La variedad de climas, la vasta y diversa naturaleza libre de contaminación proveniente de residuos industriales y tratamientos con pesticidas, permiten la abundante cosecha de variadas mieles de alta calidad. Pero no sólo la producción de miel es la que otorga a esta actividad un merecido reconocimiento de calidad, existe una diversificación de productos orientada a incorporar opciones que brindan un beneficio económico adicional en el mercado, entre ellos la jalea real, la cera de abejas, el polen y el propóleos.

El propóleos nacional puede constituir una oportunidad interesante de aprovechamiento de nuestros recursos naturales para acceder a mercados exigentes en donde países como Argentina y Brasil ya ocupan un lugar de liderazgo. En nuestro país, la producción y venta de propóleos se realiza a pequeña escala todavía. El número total de apicultores está estimado en un rango entre 10,000 y 12,000. La

mayoría de ellos son apicultores amateurs con una docena de colmenas. Solamente la mitad de ellos posee un conocimiento técnico acerca de las abejas. Los apicultores profesionales representan menos del 5%.⁷

Las principales formas de comercialización son propóleos en bruto y productos con agregados de propóleos tales como caramelos, tintura de propóleos, esencia de propóleos, etc. Con respecto a la calidad, algunas características que le otorgan un valor agregado al propóleos peruano constituyen la altura de la zona de recolección y la escasa o nula contaminación de la región.⁷

Uno de los problemas que presenta el propóleos, está en su recolección, ya que se puede dar en muy poca cantidad. Existen dos procesos que son capaces de forzar a las abejas para que elaboren más propóleos: el primero que consiste en desprender el *Própolis* de aquellas zonas donde se encuentra adherido mediante una espátula; y otra que consiste en colocar sobre los cuadros de la colmena una lámina metálica perforada que rápidamente será propolizada por las abejas.⁸

1.2. Tratamiento, producción y exportación

La producción y exportación de miel es una actividad económica importante en el Perú, sirviendo como una fuente de ingresos adicionales para los campesinos. Actualmente la apicultura tiene únicamente a la miel como producto primario y solo un grupo reducido de apicultores (menos del 10%) cosechan polen o jalea Real y ninguno de estos colectan propóleos, a pesar de la posibilidad de aprovechar estos productos con alto potencial económico.⁹

El propóleos que recolectan las abejas en el Perú, no está siendo aprovechado, ya que no existen técnicas descritas sobre su recolección, tratamiento, procesamiento y almacenaje; además de un estudio que indique su calidad. Para establecer estándares de calidad adecuados es necesario cuantificar algún compuesto químico que permita su comparación con diferentes tipos de propóleos.

El problema que presenta su estudio y comparación, es que cada tipo de propóleos varía de acuerdo a su ubicación geográfica.⁹

1.3. Productos derivados de la colmena

La utilización de los productos de las colmenas, por el ser humano data desde hace más de 10 mil años en una pintura rupestre que se encuentra en Valencia España en La Cueva de la Araña, donde se distinguen a dos hombres cosechando un enjambre. Los productos que se obtienen a través de la práctica de la apicultura se pueden clasificar en directos e indirectos: Directos: Miel, cera, polen, jalea real, propóleos, enjambres y subproductos, en su mayoría derivados de la miel, vino de miel, hidromiel, vinagre de miel y licores. Indirectos: consiste en la polinización que llevan a cabo las obreras de una multitud de flores y plantas que solamente se polinizan y producen frutos y semillas con intervención de los insectos, entre los cuales se incluye en primer lugar la abeja doméstica “*Apis mellífera*”.¹⁰

2. Propóleos

2.1. Historia

Hace 600 años a.C. los egipcios observaron en el propóleos la capacidad de evitar la descomposición de los cadáveres, utilizándolo en la técnica de embalsamar. A principios de siglo, la medicina reconoció “oficialmente” en el propóleos propiedades terapéuticas.

Esta sustancia, elaborada por las abejas, es conocida por el hombre desde tiempos remotos. Así, la utilizaban los sacerdotes del antiguo Egipto y más tarde los griegos, a quienes les debemos el nombre “Propóleos” donde “pro” significa “delante de” y “polis” significa “ciudad”. Aristóteles ya habla de ella en su historia de animales, y la considera como “remedio para las infecciones de la piel, llagas y supuraciones” Incluso aparece citado en el Corán y se tiene constancia de que los incas lo utilizaban cuando se presentaba un cuadro de infecciones febriles.¹¹

Galeno, en el siglo II, menciona el propóleo en sus trabajos, y el famoso médico y filósofo persa Avicena, en el siglo XI, dice del propóleo “Tiene la cualidad de eliminar las puntas de flechas y las espinas, vivifica, limpia fácilmente y ablanda fuertemente”.

Su máximo empleo se dio durante la guerra de los Boers, en África del Sur, alrededor de 1900, en el tratamiento de heridas infectadas y como sustancia cicatrizante. Los cirujanos ingleses comprobaron la acción cicatrizante del propóleo y atribuyeron a ello la baja mortandad por gangrena

El estudio científico del propóleo se inició en la década del 60 en los países de Europa del Este.

Centros de referencia internacional mediante sofisticados métodos analíticos, develaron la compleja composición del propóleo ^{12 13}, describiéndose más de 100 componentes que actúan en sinergismo. Los más importantes son polifenoles, entre los que se destacan los flavonoides, siendo su actividad antibacteriana una de las más importantes.^{14,15}

Su utilización se ha mantenido durante siglos, hasta llegar a nuestros días, en que cada vez se realizan más investigaciones sobre preparados a base de propóleo dentro del ámbito de ciencias de la salud

2.2. Definición

Se da el nombre de propóleo, a una mezcla de cantidades variadas de resinas, recogidas por la abeja de las plantas, particularmente de las flores y de los brotes de la hoja. Deriva del Griego “*Própolis*” que significa **pro** (en defensa de) y **polis** (la ciudad) “defensa o defensor de la ciudad”, entendida esta como sinónimo “para la defensa de la colmena” da la idea de un compuesto muy importante para las abejas, cumpliendo así funciones defensivas y balsámicas.¹⁶

Tabla N° 1 Clasificación taxonómica de *Apis mellifera*.⁹

TAXONOMÍA
• Reino: animalia
• Filo: arthropoda
• Clase: insecta
• Orden: hymenoptera
• Sub orden: apocrita
• Superfamilia: apoidea
• Familia: apidae
• Subfamilia: apinae
• Género: apis
• Especie: <i>A. mellifera</i>

Abeja Europea, conocida como abeja doméstica o melífera lleva el nombre científico de *Apis mellifera*, es la especie de abeja con mayor distribución en el mundo, originaria de Europa, África y Asia, fue introducida en América y Oceanía.

Las *Apis melliferas* son la especie de abejas que recoge el propóleos, consideradas como abejas de miel y son oportunistas.¹⁶

Estas abejas raspan las resinas protectoras de los brotes de la flor y de la hoja con sus mandíbulas y después las llevan a la colmena en sus piernas traseras, es probable que en el proceso de recoger y morder las resinas, se mezclen con un poco de saliva y otras secreciones de las abejas así como con la cera.¹⁶

La forma como estos insectos trasladan estos restos resinosos es tomándolo con sus mandíbulas y es con la ayuda del primer par de patas que se lleva la sustancia hasta sus glándulas mandibulares donde secretan el ácido 10-dihydroxidecenoico haciendo que el propóleos se ablande para tritarlo y transportarlo a las celdillas de polen, cuando la abeja llega a la colmena, las abejas propolizadoras le ayudan a descargar el propóleos y a continuación toman algunas partículas de la sustancia, la comprimen y le agregan cera para proceder al propolizado.¹¹

Así, el propóleos es utilizado por las obreras entre otros, para recubrir las celdas de los panales antes de la puesta de huevos por parte de la reina, con vistas

a una desinfección de la zona, quizás el uso más importante de todos es mezclar cantidades pequeñas de propóleos con la cera para fijar los huevos de la reina. Estas aplicaciones son significativas porque se aprovechan los efectos antimicrobianos del propóleos en la protección de la colonia contra enfermedades. Además, el uso del propóleos reduce la probabilidad de la infección de la cría y el crecimiento de bacterias en la descomposición de tejido de animales muertos.¹⁶

2.3. Características

Se sabe que muchos apicultores están enfocados a la producción de miel, pero también existen algunos que se han preocupado por la recolección de otros productos de colmena, entre ellos, el Propóleos. Resina, de composición compleja, consistencia viscosa, compuesta de cera y exudados resinosos, extraídas de ramas, hojas, yemas de los árboles y utilizada en la construcción, reparación, aislamiento y protección de su colmena.¹⁷

El propóleos de la especie *Apis mellifera* es reconocida por las propiedades biológicas que posee, como: desinfectante, antibacteriano, antifúngico, antioxidante, antiinflamatoria, antiséptico, anestésico, cicatrizante, regeneradoras de tejidos, entre otras, y por todas estas propiedades, el Propóleos tiene asombrosas aplicaciones en dermatología, producto indicado para tratar heridas, quemaduras, incluso el acné; y siendo así es un componente muy utilizado en la estética (cremas desmaquilladoras, preparados antiarrugas, leches corporales), empleado como regulador del apetito, a la vez como hepatoprotector; y que es sin duda un potente agente antigripal.¹⁷

Además, como un pequeño dato cabe señalar, que es utilizado desde tiempos remotos en la industria de la madera, como laca para muebles e instrumentos musicales de cuerda ya que la resistencia de la laca del propóleos es tan elevada que hace que la superficie de madera sea impermeabilizante (resista incluso al contacto con agua hirviendo).⁸

Dentro de las características naturales del propóleo se sabe que varía de colmena a colmena, de distrito a distrito, y desde una estación a otra. Por lo general, tenemos una variedad de colores que van desde un marrón oscuro, pero se puede encontrar en tonos verdes, rojos, negros y blancos, dependiendo de su origen botánico y edad; tiene un sabor acre, frecuentemente amargo, de olor agradable y dulce, de forma que cuando se quema, se exhala una fragancia de resinas aromáticas.¹⁸

En cuanto al papel biológico de la resina de los árboles, es sellar herméticamente su colmena, defenderse contra las bacterias, hongos e insectos, impedir cualquier tipo de infección, siendo lo más importante, embalsamar a los seres vivientes que han sido asesinados por las abejas después de una invasión de la colmena, evitando así la descomposición de estos.⁸

El propóleo, que es un material lipófilo, duro y quebradizo; al estar a una temperatura menor a 15°C cuando es congelado o cercano a la congelación el propóleo es duro y frágil; al estar a una temperatura entre 25°C a 45°C, el propóleo llega a ser una sustancia suave, flexible y muy pegajosa; pasando los 45°C se volverá más pegajoso y gomoso; la mayoría de propóleos se vuelven líquidos a 60°C o 70°C, pero para algunas muestras de propóleos el punto de fusión puede ser tan alto como de 100°C.¹⁶

Los solventes más comunes usados para las extracciones comerciales son éter, etanol (alcohol etílico), glicol y agua. Para el análisis químico una gran variedad de solventes se puede utilizar para extraer varias fracciones. Muchos de los componentes bactericidas son solubles en agua o alcohol.¹⁶

2.4. Composición

En un análisis de propóleos en Inglaterra, 150 compuestos fueron identificados en una sola muestra, pero actualmente se han identificado más de 180 compuestos aislados entre distintas muestras de propóleos, con cada nuevo análisis se encuentran nuevos compuestos, estas resinas son recogidas de una gran variedad de árboles y de arbustos, de cada región y colonia de abejas, que da lugar a la gran variación de color, olor y composición.¹⁶

Los constituyentes que forman a los propóleos son muy heterogéneos y dependerán de las diversas sustancias exudadas por las especies vegetales que las abejas visitan. Dichos compuestos no son indispensables para la vida de la planta y se les conoce como metabolitos secundarios^{17,19}.

Algunos autores describen al propóleos como una mezcla de composición química compleja que contiene bálsamos, aceites etéreos, polen, vitaminas, algunos minerales y proteínas, sustancias que le confieren una variedad de propiedades biológicas de gran interés para fines terapéuticos.²⁰

Una lista de las clases principales de productos químicos en propóleos se da con referencias a algunas revisiones recientes y análisis de diversos países. Los compuestos principales son integrados por los flavonoides y ácidos fenólicos o sus ésteres, que a menudo forman más del 50% de todos los componentes.

Una lista de las principales clases de productos químicos en propóleos se da con referencias a algunas revisiones recientes (**Tabla N° 2**) en donde se han aislado más de 180 compuestos, siendo como sus principales componentes resinas y bálsamos que contienen flavonoides y ácidos fenólicos o sus ésteres. Además, contienen pequeñas cantidades de terpenos, taninos, restos de la secreción de las glándulas salivares de las abejas y posibles contaminantes. Los compuestos activos son los flavonoides que incluyen flavonas, flavonoles, flavononas y flavononoles.^{16,21}

Tabla N° 2 Composición, porcentaje y características del Propóleos.²²

COMPOSICIÓN	PORCENTAJE	COMPUESTOS, CARACTERÍSTICAS Y OBSERVACIONES
RESINAS	45% - 55%	Flavonoides, ácidos fenólicos y esterés.
CERAS	7.55% - 35%	Mayoría cera de abeja, también de origen vegetal.
ACEITES ESENCIALES	5% - 10%	Volátiles
ÁCIDOS GRASOS	5%	La mayoría proceden de la cera y el resto dependen del origen botánico.
PÓLEN	5%	Proteínas del polen y aminoácidos libres. Predominan arginina y prolina.
OTROS COMPUESTOS ORGÁNICOS Y MINERALES	5%	14 oligoelementos Fe y Zn son los más abundantes, otros: Au, Ag, Cs, Hg, K, Sb. Cetonas. Lactonas. Quinonas. Esteroides. Ácido benzoico y ésteres. Vitaminas: B1, B2, B3, B6. Pequeñas cantidades procedentes principalmente del polen, azúcares.

2.5. Propiedades farmacológicas

Los propóleos poseen un amplio espectro de actividades biológicas tales como antimicrobiana, antifúngica, antiviral, antioxidante, antiproliferativa, entre otras. Existe en la literatura gran cantidad de datos publicados acerca de todas estas actividades biológicas, los cuales se basan en evaluar los efectos tanto de extractos como de compuestos aislados e identificándose propóleos de diferentes partes del mundo.

Los principales responsables de la actividad antimicrobiana son los *flavonoides* galangina y pinocembrina y los *derivados de los ácidos benzoicos*, ferúlico y cafeico.²³

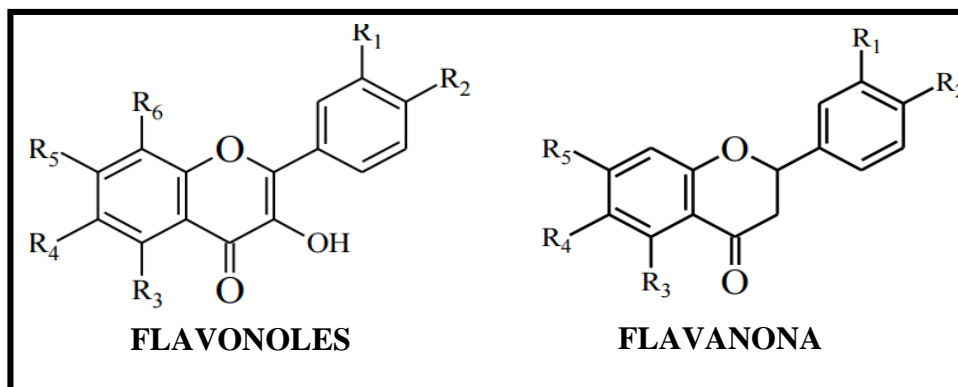


Figura N° 1 Principales componentes químicos responsables de la actividad antimicrobiana, flavonoides.²⁴

Tabla N° 3 Ejemplo de diferentes clases de flavonoides naturales.²⁴

NOMBRE TRIVIAL	R1	R2	R3	R4	R5	R6
Galangina	H	H	OH	H	OH	H
Pinocembrina	H	H	OH	H	OH	H

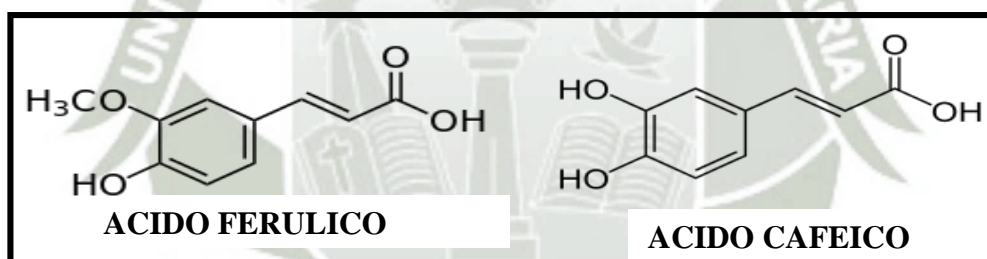


Figura N° 2 Principales componentes químicos responsables de la actividad antimicrobiana, derivados de los ácidos benzoicos.²⁴

Tabla N° 4 Ejemplo de diferentes clases de flavonoides naturales.²⁴

NOMBRE TRIVIAL	R1	R2	R3	R4	R5	R6
Ácido Ferúlico	H	H	OCH3	OH	H	H
Ácido Cafeico	H	H	OH	OH	H	H

El efecto antimicrobiano actúa sobre los gérmenes Gram positivos como el Estafilococo dorado, Estreptococo beta hemolítico y algunos Gram negativos como Pilocianico y Proteus.²⁵ Estos resultados se presentan en la obra de Kujumgiev et al

(1999), donde expone muestras de propóleos de diferentes regiones geográficas (zonas tropicales y templadas) contra *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. Todas las muestras presentaban una actividad antimicrobiana significativa frente a *Staphylococcus aureus* y, sin embargo, ninguna era activa contra *Escherichia coli*²³.

Dentro de otros estudios de la capacidad antibacteriana del propóleos se demostraba la acción antibacteriana del propóleos de origen brasileño mediante el *Staphylococcus aureus* metilino resistente, donde Yamamoto establece que el componente responsable de esta acción antibacteriana es un derivado de ácido cinámico que posee una potencia entre 100 y 400 veces mayor que los demás compuestos²⁶.

En otro estudio en un Instituto de Investigación evaluaron la capacidad antimicrobiana de varios propóleos ante el *Helicobacter pylori*, donde una muestra de propóleos Argentinos demostró su capacidad de actuación frente a esta bacteria. Ya en los años 90 el Departamento de Bioquímica de la Universidad de Oxford, publica un estudio donde se informa que el ácido cinámico y algunos flavonoides son los causantes de desactivar la energía de la membrana citoplasmática, inhibiendo así la motilidad bacteriana y, haciéndola más vulnerable al ataque del sistema inmunológico y potenciando los antibióticos²⁶.

La actividad antifúngica del propóleos se asoció también a la presencia de flavonoides, se considera al propóleos como el producto de las abejas con mayor actividad antifúngica según pruebas realizadas con 40 cepas de levaduras de *Candidas* donde se inhibió su crecimiento. La cepa más sensible fue la *Rhosotorula spp* y la más resistente fue la *Candida albicans*²³.

3. Extracción

Extracción, como el término se utiliza farmacéuticamente, implica la separación de partes activas medicinalmente de tejidos vegetales o animales de los componentes inactivos o inertes mediante el uso de disolventes selectivos. Los productos así

obtenidos a partir de plantas son relativamente líquidos impuros, semisólidos o polvos destinados sólo para uso oral o externa. Estos incluyen clases de preparaciones llamadas decocciones, infusiones, fluido extractos, tinturas, pilular (semisólida) extractos y extractos en polvo. Tales preparaciones han sido llamadas popularmente la galénica, el nombre de Galeno, el segundo siglo médico griego.

Los efectos de los procedimientos de extracción estandarizados para el crudo de los medicamentos son para alcanzar la porción terapéuticamente deseada y para eliminar el material inerte con el tratamiento de un disolvente. El extracto obtenido de este modo puede estar listo para su uso como un agente medicinal en forma de tinturas y extractos, que puede procesarse adicionalmente para ser incorporado en cualquier forma de dosificación tal como comprimidos o cápsulas, o puede ser fraccionado para aislar entidades químicas individuales.

3.1. Tipos de extractos

Los extractos son preparados, concentrados de consistencia sólida, líquida o intermedia, derivados generalmente de material vegetal desecado, se obtienen al evaporar parcial o totalmente el disolvente en los líquidos extractivos de origen vegetal. Los extractos según su consistencia y concentración de principio activo se clasifican en: extractos fluidos, secos, blandos y los crio extractos.

3.1.1. Extractos secos

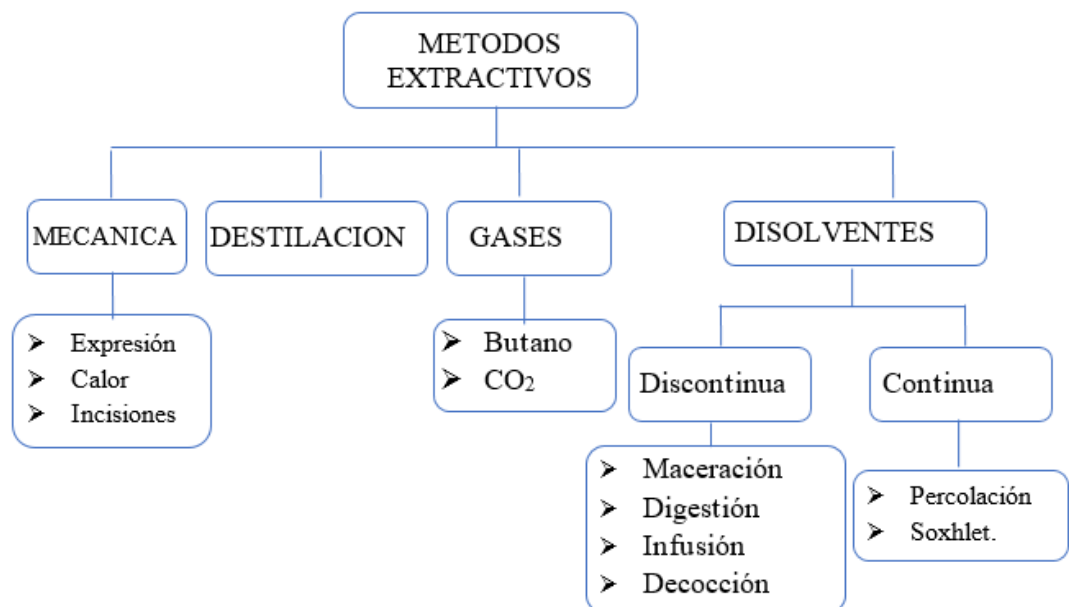
Los extractos secos son aquellos que tienen una consistencia seca y son fácilmente pulverizables, se obtienen por evaporación del disolvente y desecación del residuo. Los extractos secos no deben presentar un contenido de humedad mayor del 5% (Voigt, 1982). Presentan una concentración muy superior de principio activo que la droga original, son preparados bastante estables (aunque en ocasiones resultan higroscópicos) y de fácil manipulación; como líquido extractor se utiliza alcohol de diversa concentración y agua⁹.

3.2. Métodos de extracción

Deben de obedecer a la información de la naturaleza química de las sustancias presentes en la muestra a analizar y al propósito de la investigación. Frecuentemente se usa la extracción con solventes orgánicos de bajo punto de ebullición (alcohol, acetato de etilo) y de baja reactividad. Algunas veces conveniente desengrasar el material con éter de petróleo o hexano. El alcohol es generalmente eficaz para recuperar la mayoría de los metabolitos secundarios. Los extractos son evaporados bajo presión reducida o liofilizados, en el caso de extracción con agua ²⁷.

Los métodos de extracción se basan en las diferentes solubilidades de los diversos compuestos encontrados en la muestra a analizar, así, para sustancias de baja polaridad (lípidos) se utilizan solventes como éter de petróleo y cloroformo; para sustancias de mediana y alta polaridad el acetato de etilo, etanol y la acetona²⁷.

En el siguiente esquema podemos observar los diferentes métodos de extracción:



Esquema N° 1 *Clasificación de Métodos de Extracción.*²⁸

3.2.1. Percolación

Es un procedimiento que se realiza a temperatura ambiente. La muestra se coloca en una columna y está en contacto permanente con el disolvente que gotea por la parte superior de la columna, atraviesa toda la zona donde se encuentra la droga con los principios activos, los va extrayendo y, por la parte inferior, se recogen los líquidos extractivos que contienen los principios activos. La percolación puede llegar a conseguir extracciones prácticamente completas de la droga pero con un elevado consumo de disolvente ²⁸. En este método el mensturo (generalmente mezcla hidroalcohólica) atraviesa la masa de droga pulverizada siempre en un solo sentido, alcanzando concentraciones crecientes de tal modo que el equilibrio entre el solvente dentro o fuera del marco nunca se alcanza, por lo que la droga bañada siempre por nuevas proporciones de mensturo acaba por ceder todos sus componentes solubles de manera progresiva (Selles, 1992) ²⁹.

Este tipo de extracción se realiza en recipientes (percoladores) cilíndricos o cónicos que poseen dispositivos de carga y descarga, lográndose una extracción total de los principios activos (prácticamente se obtiene hasta el 95% de sustancias extraíbles); se debe tomar en cuenta que el tiempo en el que la droga y el líquido extractivo (cantidad de disolvente), son dos factores decisivos dentro de la percolación. Cabe recalcar que previo a la extracción es necesario humectar la droga con el disolvente, permitiendo su esponjamiento con el fin de facilitar la entrada del mensturo en las membranas celulares durante la percolación ²⁹.

4. Cromatografía

La cromatografía (del griego chroma = color, graphos = escritura) es un proceso fisicoquímico, se refiere a los procedimientos utilizados para separar y caracterizar sustancias sobre la base de su tamaño, carga iónica o solubilidad en determinados solventes. Separa componentes de una mezcla en movimiento por adsorción o separación diferencial de estos componentes sobre una superficie estacionaria o inmóvil.³⁰

ADSORCIÓN: Es el depósito y retención selectiva de sustancias sobre la superficie de sólidos finamente divididos por efecto de fuerzas fisicoquímicas.

4.1. Principios de la cromatografía

La cromatografía es esencialmente un método físico de separación, en los que los componentes a separar constan de dos fases: la móvil y la estacionaria. La primera contiene y transporta a la muestra que se va a analizar a través de la fase estacionaria. La segunda mantiene las condiciones necesarias para separar diversas sustancias (analitos) contenidas en la muestra estudiada.³⁰

El proceso cromatográfico se da como resultado de repetidos procesos de sorción-desorción durante el movimiento de los componentes de la mezcla arrastrados por la fase móvil a lo largo del lecho estacionario (elución), produciéndose la separación debido a las diferencias en las constantes de distribución de los componentes de la mezcla entre la fase estacionaria y la móvil. A la distribución final de los componentes en función de su posición sobre el lecho estacionario, o del tiempo en que eluyen se le denomina cromatograma. Éste, es el gráfico de los picos de elución producidos por cada analito presente en la muestra. Los tiempos de retención se usan para identificar analitos específicos de manera definitiva mediante la inclusión de controles y estándares fiables. La altura de cada pico puede usarse para determinar la cantidad de analito presente en cada muestra.³⁰

Prácticamente no existen restricciones sobre la naturaleza de las fases a utilizar, la fase móvil puede ser gaseosa o líquida. La fase estacionaria también puede ser líquida o sólida y suele estar contenida dentro de algún diseño de columna, por lo que es posible, en principio, realizar por medio de estas técnicas la separación de los componentes de cualquier mezcla. Por otra parte, la utilización de las técnicas cromatográficas no está exenta de dificultades, debido fundamentalmente a la gran cantidad de parámetros que pueden influir en el proceso de separación, lo cual dificulta la elección de las condiciones óptimas de separación y en muchas ocasiones implica la irreproducibilidad de los resultados. Por ello la

cromatografía no es una técnica de rutina que pueda aplicarse sin más a cualquier mezcla, sin invertir en muchos casos gran cantidad de esfuerzo y tiempo.

4.2. Cromatografía en capa fina (TLC)

Los métodos de Cromatografía de Capa Fina son importantes y vigentes, porque se separan e identifican simultáneamente. Los componentes de la mezcla ascienden más o menos según su polaridad, los menos polares ascienden en primer lugar y los disolventes más polares avanzan menos. El grado de afinidad depende de la estructura química de las sustancias a separar y de las fases. La afinidad se produce por la posibilidad de establecer enlaces químicos: puentes de Hidrógeno, fuerzas de Van Der Waals, interacciones dipolo-dipolo, enlaces iónicos, etc.

Se emplea una cuba cromatográfica; usando láminas de aluminio con sílica-gel los cuales son cortadas en un tamaño de 3 por 10 cm. Se traza una línea de 1 cm del borde de la placa con un lápiz para hacer aplicaciones de muestras y estándares en forma de punto o barra. Las aplicaciones deben realizarse en carriles de 1 cm de ancho y debe quedar espacios de 1 cm entre aplicaciones. Las aplicaciones se realizarán a 1 cm del borde inferior de la placa, el cual es el punto de origen y se aplica el sembrado con capilares ^{31,32}.

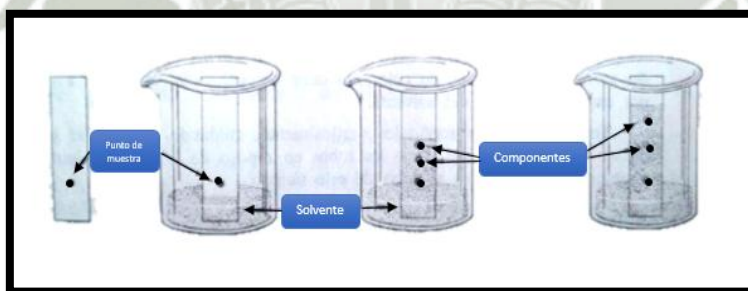


Figura N° 3 Separación de una muestra en Cromatografía en Capa Fina³³

4.2.1. Factor de retención (Rf)

Es un número que permite identificar sustancias, considerando las distancias recorridas en un cromatograma y con un método cromatográfico dado. Cada sustancia tiene un RF único y específico, por medio del cual se los identifica.⁹

5. Descripción de los microorganismos en estudio

5.1. *Staphylococcus aureus*

Tabla N° 5 Clasificación científica de *Staphylococcus aureus*.³⁴

NOMBRE BINOMIAL	<i>Staphylococcus aureus</i>
CLASIFICACION CIENTIFICA	<ul style="list-style-type: none"> • Reino: Bacteria • Filo: Firmicutes • Clase: Bacilli • Orden: Bacillales • Familia: Staphylococcaceae • Género: Staphylococcus • Especie: <i>Staphylococcus aureus</i>

5.1.1. Generalidades

El nombre del género procede del griego staphylé, que significa “en racimo de uvas”. Las bacterias del genero *Staphylococcus* son cocos (bacterias de forma esférica) grampositivas, de 0.5 a 1.5 μm de diámetro, que se agrupan de forma irregular. Muchas veces, pero no siempre, presentan un pigmento de color amarillo dorado (de ahí el nombre de *Staphylococcus aureus* o Estafilococo dorado) sus colonias presentan una consistencia cremosa, casi todas ellas pueden producir hemólisis beta o no ser hemolítico, son bacterias muy resistentes al calor y la desecación que pueden crecer en medios con elevada salinidad (7.5% de ClNa)³⁰.

En humanos forma parte de la flora normal de la piel, de la nasofaringe y del sistema gastrointestinal (20 – 50% de portadores), también en los animales¹².

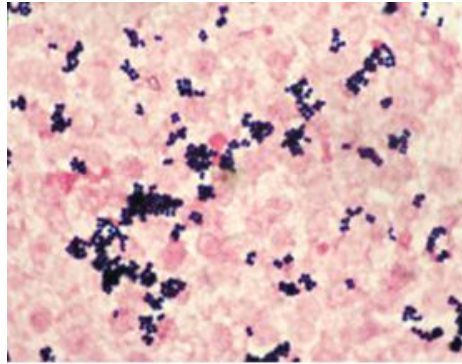


Figura N° 4 Tinción de Gram. Agrupación característica en “racimo de uvas” del genero *Staphylococcus*³⁴

En el siguiente cuadro se muestran las características de *Staphylococcus aureus*.

Tabla N° 6 Características generales de *Staphylococcus aureus*.³⁴

CARACTERISTICAS STAPHYLOCOCCUS AUREUS
<ul style="list-style-type: none"> • Bacterias esféricas (cocos) • Grampositivas • Agrupación típica en racimos • Catalasa positivo • Anaerobios facultativos • Inmóviles • No esporulados • Crecimiento rápido (18 a 24 hrs) • Resistente a condiciones ambientales adversas

5.1.2. Cultivo y aislamiento

Su crecimiento es muy bueno en medios de cultivos no selectivos como agar sangre, agar chocolate o agar infusión cerebro corazón. En caso contrario al trabajar con muestras clínicas en donde podríamos encontrar bacterias Gramnegativas, será necesario incluir un medio selectivo.

El medio más utilizado para el aislamiento de *Staphylococcus aureus* es Manitol salado (medio de chapman), que por su elevado contenido en sal inhibe el crecimiento de la mayoría de las bacterias Gramnegativas.

5.1.3. Pruebas de identificación

El género *Staphylococcus* incluye 42 especies diferentes, encontrándose ampliamente distribuidos en el ambiente, en humanos y en animales. En humanos forma parte de la flora normal de la piel, nasofaringe y del sistema gastrointestinal.

Pruebas de identificación

- Prueba de la Catalasa: Positivo
- Prueba de la Coagulasa: Positivo
- Fermentación del Manitol: Positivo
- Prueba de Oxidación Fermentación de Hugh-Leifson: Positivo

Una vez aislado *Staphylococcus aureus*, la identificación puede realizarse mediante unas pocas pruebas bioquímicas. Para la detección de generos, *Staphylococcus aureus* es catalasa positivo, diferenciando con esta prueba bioquímica de los otros generos de *Streptococcus* y *Enterococcus* (catalasa negativo).

Tabla N° 7 Características bioquímicas que permiten diferenciar *Staphylococcus aureus* de las principales especies patógenas de *Staphylococcus*, coagulasa negativa.³⁴

Propiedad	S. Aureus	S. Epidermidis	S. Saprophyticus
Colonias pigmentadas	+	-	-
Producción de coagulasa	+	-	-
Proteína A	+	-	-
Producción de ADNsa	+	-/v*	-
Fermentación de manitol	+	-/v	-
Sensibilidad a novobiocina	-	-	+

V= Variable. Varias cepas de S. epidemidis presentan una débil actividad ADNasa y pueden fermentar manitol.*

5.1.4. Patogenicidad

Aproximadamente un 40% de los adultos son portadores nasales de este microorganismo y un 10% de las mujeres lo llevan en la vagina. Entre las

manifestaciones clínicas causadas por *Staphylococcus aureus*, las más habituales son las lesiones superficiales de la piel (forunculos, urzuelos) y abscesos localizados en otros sitios. Este microorganismo es también responsable de procesos más serios, causa infecciones profundamente arraigadas como, la osteomielitis, endocarditis, meningitis e infecciones cutáneas más graves que se pueden originar por la entrada del microorganismo si existe una herida en la piel, lo que permite su diseminación hacia otros órganos. Es la mayor causa de la infección de las heridas quirúrgicas en el Hospital (nosocomiales)¹⁸

5.1.5. Tratamiento

Las cepas de *Staphylococcus aureus* no productoras de β -lactamasa son sensibles a la penicilina G y a otros compuestos β -lactámicos. Las cepas resistentes a la penicilinas G, productoras de β -lactamasas, son sensibles a penicilinas β -lactamasa-resistentes, a cefalosporinas y a la Vancomicina.

Un problema muy importante, a nivel clínico y epidemiológico, lo constituyen las cepas resistentes a la meticilina (MRSA), cuya resistencia a compuestos β -lactámicos no depende de la producción de β -lactamasas. La mayor parte de estas cepas son resistentes a un gran número de antibióticos pero algunas son sensibles a la Vancomicina^{13,16}

5.2. *Escherichia coli*

Tabla N° 8 Clasificación científica de *Escherichia coli*.³⁵

NOMBRE BINOMIAL	<i>Escherichia coli</i>
CLASIFICACIÓN CIENTÍFICA	<ul style="list-style-type: none"> • Dominio: Bacteria • Filo: Proteobacteria • Clase: Gammaproteobacteria • Orden: Enterobacteriales • Familia: Enterobacteriaceae • Género: <i>Escherichia</i> • Especie: <i>Escherichia Coli</i>

5.2.1. Generalidades

Bacilo Gramnegativo, móvil. No delicado, anaerobio facultativo de la familia Enterobacteriaceae, tolera la bilis, capaz de crecer a 44°C. Esta bacteria coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento y se le considera un microorganismo de flora normal, pero existen cepas que son patógenas y causan daño produciendo diferentes cuadros clínicos¹³

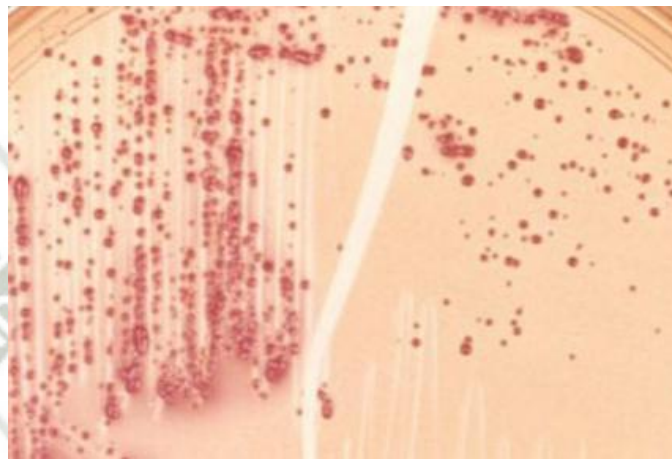


Figura N° 5 *Escherichia coli* en agar MacConkey³⁵

Tabla N° 9 Características generales de *Escherichia coli*.³⁰

Género: <i>Escherichia coli</i>
<ul style="list-style-type: none"> • Gramnegativo • Anaerobio facultativo • Bacilo corto (extremos redondeados) • Presenta movilidad • Colonias redondas, convexas, lisas con bordes definidos • Crecimiento a 45°C • No forman esporas • Cadena de ADN

5.2.2. Cultivo y aislamiento

La mayoría de los microorganismos de la familia enterobacteriaceae crecen bien en los medios de cultivo como agar chocolate, agar sangre y agar

Mac Conkey. Y como medios selectivos de cultivos se suele usar agar Hektoen enterico.³⁵

Algunas cepas pueden producir hemólisis en agar sangre la identificación completa se basa en reacciones bioquímicas¹⁹.

5.2.3. Pruebas de identificación

Una vez aislado *Escherichia coli* crece con facilidad en medios rutinarios y en medios diferenciales, la identificación puede realizarse mediante unas pocas pruebas bioquímicas.³⁵

Tabla N° 10 Características bioquímicas de *Escherichia coli*.³⁶

PRUEBA	REACCIÓN
Movilidad	+ (casi siempre)
Indol	+
Manitol	+
Rojo de metilo	+
Voges proskauer	-
Citrato de Simons	-
SH2	-
Lisina	+
Urea	-
Fermentación de glucosa	+
Fermentación de lactosa	+

5.2.4. Patogenicidad

La transmisión es por vía fecal-oral. Infección del tracto urinario, infección de herida postoperatoria, enfermedades diarreicas, meningitis neonatal y septicemia³⁷.

5.2.5. Tratamiento

Para las infecciones urinarias como cistitis o bacteriemia asintomática basta la administración de clotrimazol.

5.3. *Pseudomona aeruginosa*

Tabla N° 11 Clasificación científica de *Pseudomona aeruginosa* 32

NOMBRE BINOMIAL	<i>Pseudomonas pyocyanea</i>
CLASIFICACIÓN CIENTÍFICA	<ul style="list-style-type: none"> • Dominio: Bacteria • Filo: Proteobacteria • Clase: Gamma proteobacteria • Orden: Pseudomonadales • Familia: Pseudomonadaceae • Género: Pseudomonas • Especie: <i>Pseudomona aeruginosa</i>

5.3.1. Generalidades

Se definen como bacilos Gramnegativos, casi siempre móviles, es una bacteria flagelada con forma de bastoncillo por uno o varios flagelos polares, que produce pigmentos fluorescentes de colores que pueden variar desde el rojo hasta el negro, pigmentos como la “pioverdina y piocianina”, este último específico de *Pseudomona aeruginosa*, aerobios estrictos (si bien algunas especies pueden emplear como aceptor alternativo al nitrógeno) y cuyo metabolismo utiliza solo la vía oxidativa.

Pseudomonas, son bacterias muy repartidas en la naturaleza, siendo su hábitat fundamental el suelo y el agua, y de ahí pasan a todos los seres vivos, vegetales, animales y hombre. En el ser humano puede encontrarse en las zonas más húmedas del cuerpo, como son las axilas, los oídos y la zona alrededor del ano. Caracterizada por ser el prototipo de bacteria oportunista que infecta individuos con poca capacidad de resistencia.³⁸

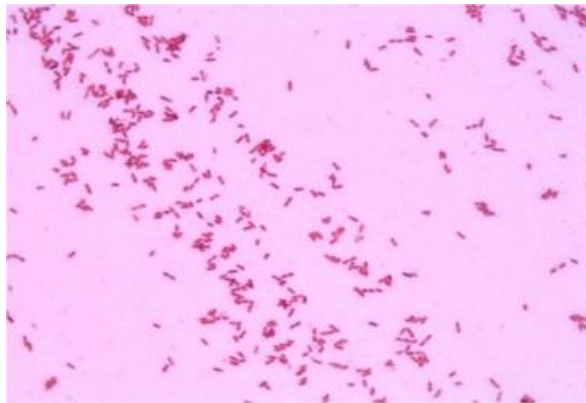


Figura N° 6 *Pseudomonas aeruginosa* bacilo recto o ligeramente curvado, aislado, agrupado en parejas o cadenas cortas

Tabla N° 12 Características generales de *Pseudomona aeruginosa*³⁸

Género: Pseudomona
<ul style="list-style-type: none"> • Gramnegativos • Presenta movilidad • Flagelos polares • Aerobios estrictos • Metabolismo oxidativo • No fermentativo • Oxidasa positivo • Indol negativo • Crecimiento a 42°C • Cultivo con olor a frutas • Fluorescencia bajo Luz UV

5.3.2. Cultivo y aislamiento

Puede cultivarse en los medios más sencillos, pues sus requerimientos son mínimos. Se suelen utilizar medios comunes (agar común, agar-sangre). Un diagnóstico presuntivo de que pudiera tratarse de *Pseudomona* es el característico olor dulce y aromático debido a la producción de 2-aminocetofenona y la producción de pigmento. De los pigmentos, la piocianina (azul en medio alcalino y rojo en ácido) y la fluoresceína (amarilloverdosa) siendo los más frecuentes y dan un color verde característico que difunde a todo

el agar, el medio específico para observar esta producción de pigmentos, medio king A y B.³⁸

5.3.3. Pruebas de identificación

El diagnóstico de género se realiza por dos pruebas: medio de Hugh y Leifson, *Pseudomona aeruginosa* solo oxida la glucosa, a diferencia de las enterobacterias y *Vibrio* que la fermentan; *Pseudomona* produce oxidasa a diferencia de las enterobacterias que no la poseen.³⁸

Tabla N° 13 Pruebas bioquímicas más características de diversas especies de *Pseudomonas*.³³

TEST	<i>PSEUDOMONA AERUGINOSA</i>	<i>P. FLUORESCENS</i>	<i>P. PUTIDA</i>	<i>P. PSEUDOMALLEI</i>	<i>P. MALLEI</i>	<i>P. CEPACIA</i>	<i>P. STUTZERI</i>
Movilidad	+	+	+	+	-	+	+
Crecimiento a 42°C	+	-	-	+	+	+	+
ADH	+	+	+	+	+	-	-
Hidrolisis de almidon	-	-	-	+	V	-	+
Gelatinasa	+	+	-	+	+	V	-
Reduccion de Nitratos	+	V	-	+	+	-	+

V: El porcentaje de + o – se situa alrededor del 50%. ADH: Arginindeshidrolasa.

5.3.4. Patogenicidad

Es capaz de producir infecciones pulmonares, en la piel, oculares, oticas, infecciones óseas y articulares, infecciones gastrointestinales, infecciones genitourinarias y diversos abscesos.

5.3.5. Tratamiento

El tratamiento nunca debe ser con un solo fármaco, ya que esta bacteria genera resistencia a los antibióticos con mucha rapidez. Contra la *Pseudomona aeruginosa* se debe utilizar penicilinas activas como: ticarcilina, mezlocilina,

piperacilina, combinándolas con aminoglicosidos (gentamicina, tobramicina o amikacina).

Otros fármacos: aztreonam, imipenem, quinolonas (ciprofloxacino), cefalosporinas (ceftazidima, cefoperazona).

5.4. *Candida albicans*

Tabla N° 14 Clasificación científica de *Cándida albicans*.³⁸

NOMBRE BINOMIAL	<i>Candida stellatoidea</i>
CLASIFICACIÓN CIENTÍFICA	<ul style="list-style-type: none"> • Reino: Fungi • Clase: Saccharomycetes • Orden: Saccharomycetales • Familia: Saccharomycetaceae • Género: Candida • Especie: <i>C. albicans</i>

5.4.1. Generalidades

Candida albicans, el hongo más patógeno de este género, está ampliamente distribuido en el medio ambiente. Es un hongo dimórfico, es decir, se desarrolla de forma distinta en función de la temperatura de crecimiento, como levadura, normalmente a 37°C en el huésped, y como hongo, a 25°C en la naturaleza, se reproduce de forma sexual por gemación. Hongo que forma largas pseudohifas, diploide asexual (forma de levadura) las colonias son de crecimiento rápido, circulares, lisas, blancas o cremosas, pastosas o blandas, de bordes precisos, elevadas miden 1-3mm de diámetro.

En la especie humana, *Candida albicans* forma parte de la flora microbiana de la boca y tubo digestivo. En la mujer se localiza, además en la vagina, con mayor frecuencia durante el embarazo.³⁸

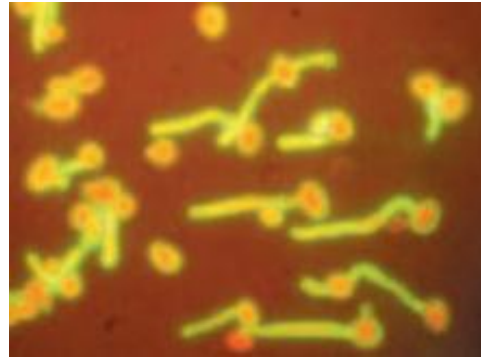


Figura N° 7 Blastoconidios y tubos germinales de *Candida albicans*.

Tabla N° 15 Características Generales de *Candida albicans*³⁸

GÉNERO CANDIDA
Hongo dimorfo
Diploide asexual
Colonias redondas u ovaladas
Presenta pseudohifas
Temperatura 37°C

5.4.2. Cultivo y aislamiento

Para la identificación rápida de *Candida albicans* se utiliza la filamentación en suero a 37°C (Es una técnica rápida que se utiliza para el diagnóstico de *Candida albicans*).³⁸

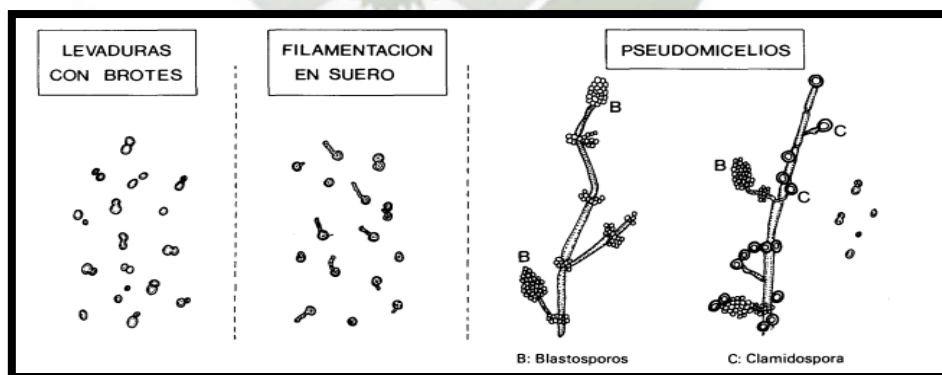


Figura N° 8 Morfología microscópica de levaduras del genero *Candida*. Prueba de filamentación en suero (esquema) Pseudomicelio con clamidospora correspondiente a *Candida albicans*³⁸

5.4.3. Pruebas de identificación

Al Gram se observan bacilos Gram negativos. Crece fácilmente en los medios de cultivo habituales como agar sangre y McConkey por sus bajas exigencias nutritivas, la identificación levaduras en el medio de Sabouraud.

5.4.4. Patogenicidad

Son muy frecuentes y pueden localizarse a nivel superficial en mucosas y piel, o bien en tejidos u órganos profundos. La forma más habitual en patología humana es el muguet, las levaduras colonizan la mucosa bucal del recién nacido (que las adquiere en el momento del nacimiento, al pasar por la vagina contaminada de la madre)³⁸

5.4.5. Tratamiento

Las infecciones mucosas y cutáneas se tratan por medio de diversas cremas tópicas, lociones, pomadas que contienen fármacos anti fúngicos del grupo de los azoles. El tratamiento tópico con agentes antifúngicos como la nistatina o el más reciente terconazol, suelen ser efectivos.

El tratamiento sistémico por vía oral se basa en la administración de fluconazol o itraconazol, en pacientes resistentes a fluconazol necesitan un tratamiento con anfotericina B por vía intravenosa o caspofungina.



MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales

1.1. Material biológico

1.1.1. Propóleos

Para realizar el presente trabajo de investigación se utilizó el propóleos de tres lugares diferentes del Sur del Perú:

- Apicultura “Mistiflor”, zona conocida como “La Central”, provincia de Castilla, departamento de Arequipa.
- Apicultura “Apiqantu”, zona conocida como “La Estrada”, provincia de Paucartambo, departamento de Cusco.
- Apicultura “Abeja Monteflor”, zona conocida como “Pampas de Mamuta”, provincia de Tarata, departamento de Tacna.

1.1.2. Agentes patógenos

Los agentes patógenos utilizados para evaluar el efecto antimicrobiano de los propóleos fueron *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa*; se emplearon cepas ATCC. Además, se usó 10 cepas patológicas de *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*, obtenidas del Hospital Honorio Delgado – Arequipa.

1.2. Material de laboratorio

- Baguetas de vidrio
- Capilares sin heparina
- Embudos de vidrio
- Matraces de vidrio 100 y 250mL.
- Placas Petri

- Probetas graduadas de: 50 y 100mL
- Tubos de ensayo
- Vasos de precipitado: 50, 250 y 500mL
- Pipetas de 1, 5 y 10mL
- Pipetas Pasteur
- Frascos de vidrio ámbar
- Mortero

2. Otros materiales

- Cubre objetos
- Porta objetos
- Asa de Kolle
- Espatula
- Hisopos
- Papel filtro
- Algodón y Gasa
- Papel aluminio
- Papel Kraf
- Pinzas
- Soporte Universal
- Gradillas
- Malla de asbesto
- Jeringas de 1ml

3. Reactivos

3.1. Reactivos químicos

- Cloroformo (Diproquim, Q.P)
- Hexano (Diproquim, Q.P)

- Etanol (Diproquim, Q.P)
- Metanol (Merck, Q.P)
- Acetato de etilo (Merck, Q.P)
- Sol. Etanólica de Vainillina (Merck, Q.P)
- Sol. Etanólica de H₂SO₄ (Merck, Q.P)
- Cloruro de Aluminio (Merck, Q.P)
- Cloruro Férrico (Merck, Q.P)
- Reactivo de Dragerndorff (Merck, Q.P)

3.2. Medios de cultivo

- Caldo BHI
- Agar Mueller – Hinton
- Agar Mac Conkey
- Agar Baird Parker
- Agar Cetrimide
- Agar Sabouraud

4. Equipos

- Equipo de Percolación
- Rota-evaporador (Buchi), Modelo:R-114
- Cuba cromatográfica
- Equipo de Luz Ultravioleta
- Autoclave Sturdy SA-260 MA
- Esterilizador J.P. Selecta 15 CE
- Estufa (Fisher, Scientific Serie 500)
- Microscopio óptico
- Balanza Analítica (Modelo A-160 Benver Instrument Company)
- Refrigerador (Coldex Autofront)
- Cocina Eléctrica (Gallehamp)

5. Métodos

5.1. Procesamiento del material de investigación (propóleos)

Como se observa en la **Figura N° 9**, los propóleos se recolectaron de los lugares antes mencionados (pág. 31), considerando que un envejecimiento no mayor a un año y medio; posteriormente se procedió a limpiar, extrayendo cualquier componente extraño como residuos de tierra, hojas, insectos y/o restos de abejas.

Para asegurar la estabilidad y facilitar la manipulación de los propóleos, se llevó a congelación, quedando el material de investigación, en estado sólido; luego, con el fin de obtener partículas de menor tamaño, se realizó una trituration, utilizando un mortero.

El almacenamiento del propóleos se realizó en recipientes de vidrio de color ámbar, a una temperatura aproximada de 5°C.



Figura N° 9 Muestras de propóleos: de Arequipa (a), Cusco (b) y Tacna (c).

Fuente: Elaboración propia.

5.2. Análisis del propóleos

5.2.1. Propiedades organolépticas

Se realizó un análisis sensorial para evaluar el olor, color, sabor y aspecto de los propóleos utilizados en el presente estudio.

5.2.2. Determinación de humedad, cenizas y grasas

Éste análisis se realizó en el laboratorio de SERVILAB, de la facultad de Ciencias Naturales y Formales de la universidad San Agustín; utilizando las técnicas descritas en las normas técnicas peruanas; NTP-209.008, para humedad; NTP-209.005, para cenizas; y NTP-209.093, para grasa.

5.3. Obtención de extractos de propóleos

La extracción de los principios activos de los propóleos se realizó por el método de percolación. El método consiste en el uso de un percolador (**Figura N° 10**) que contiene el material en estudio; entonces, se añade un solvente determinado y arrastra los compuestos de interés para luego ser recolectado (por la parte inferior del equipo). Éste proceso depende principalmente de la solubilidad y la difusión efectiva que presentan los compuestos de interés; además, es favorecido por el área superficial del material, que está en contacto con el solvente.³⁹

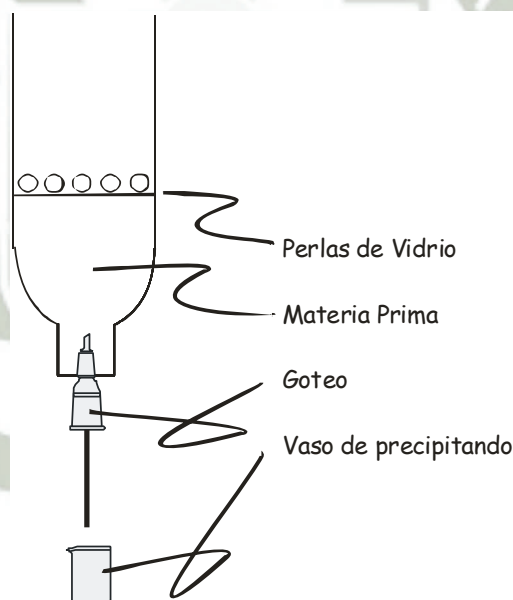


Figura N° 10 Percolador de vidrio.

Fuente: Elaboración propia.

El procedimiento de extracción se realizó según lo descrito por Jones & Kinghorn⁴⁰ con ciertas modificaciones; tal como se observa en el esquema de extracción (**Anexo 1**). se tomó el propóleos triturado, se llevó al equipo de percolación cubierto con papel de aluminio, para evitar el paso de la luz (**Figura N° 11**), se cubrió la parte superior con papel filtro y perlas de vidrio; posteriormente

se añadió el solvente. Se dejó remojar durante 12 horas y posteriormente se dejó fluir el solvente a una velocidad aproximada de 20gotas/min.

Para el estudio preliminar de la actividad antimicrobiana de los extractos de propóleos se utilizó 30g de propóleos triturado y 300mL de solvente; para los demás estudios se utilizó un total de 270g de propóleos triturado y 3L de solvente (dividido en tres partes iguales; tanto el propóleos como el solvente). Los solventes utilizados fueron etanol, cloroformo y hexano, se eligieron éstos debido a que presentan diferentes polaridades.

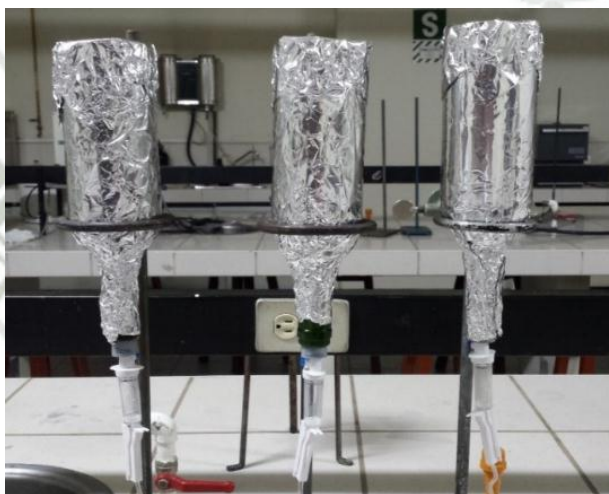


Figura N° 11 Equipos de percolación utilizados para la extracción de propóleos.

Fuente: Elaboración propia.

5.3.1. Determinación del rendimiento de extracción

El porcentaje de rendimiento de extracción (RE%) o porcentaje de sólidos solubles, se determinó mediante gravimetría con la evaporación de los solventes.

El procedimiento consistió en colocar cada extracto de propóleos (etanólico, clorofórmico y de hexano), en un vaso previamente tarado y se llevó a un baño María de 50°C – 60°C; una vez evaporado el solvente, se dejó enfriar en el desecador para obtener un peso constate y se determinó la masa final del extracto seco, utilizando la **Ecuación (1)**.

$$RE\% = \frac{\text{Masa extracto seco (g)}}{\text{Masa material estudiado (g)}} \times 100\% \quad \text{Ecuación (1)}$$

5.4. Estudio preliminar de la actividad antimicrobiana de los extractos de propóleos

Los extractos obtenidos con los tres solventes (etanol, cloroformo y hexano) se sometieron a un análisis preliminar en el que se evaluó la actividad antimicrobiana de todos los extractos mediante la determinación de la concentración bactericida o fungicida mínima (CBM o CFM) y la sensibilidad de los microorganismos a los extractos de propóleos por el método “hoyo-placa”. Este estudio preliminar permitió elegir los extractos (de los tres propóleos) con el solvente que presentó mayor actividad antimicrobiana; además, éstos fueron los extractos con los que se realizó los siguientes estudios. Todos los microorganismos utilizados en esta parte del estudio, fueron ATCC.

5.4.1. Determinación de la sensibilidad microbiana por el método “hoyo-placa”

El procedimiento consistió en colocar 5µL de cada extracto al hoyo realizado en la placa con medio de cultivo Sabouraud, Mac Conkey, Bair Parker y Cetrimida (**Figura N° 12**); que contiene los microorganismos *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa*, respectivamente. Se incubó a 37°C, durante 24horas (para las bacterias), y 48 horas a 20°C para *Candida albicans*; entonces, se determinó el diámetro de los halos formados por la inhibición del crecimiento microbiano.

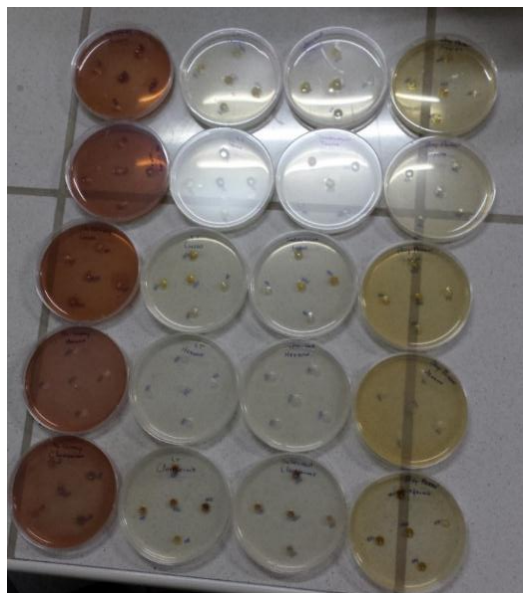


Figura N° 12 Medios de cultivo para el análisis preliminar de la actividad antimicrobiana (método “hoyo-placa”)

Fuente: Elaboración propia.

5.4.2. Determinación de la concentración bactericida o fungicida mínima

Se realizó la determinación de la concentración inhibitoria mínima y concentración bactericida o fungicida mínimo. Ésta determinación sirvió también para obtener un valor de referencia y posteriormente continuar con los siguientes estudios.

El ensayo (ampliamente explicado en el punto 5.7, Evaluación de la actividad antimicrobiana), consistió en dos fases: la primera, en la que se realizó una serie de diluciones en tubo de acuerdo a la **Tabla N° 17** y el procedimiento del punto 5.7.1.1.3 (Preparación de las diluciones); ésta fase correspondió a la determinación de la concentración inhibitoria mínima, datos que no se muestran como parte de este análisis preliminar.

La segunda fase del ensayo fue el cultivo, en placas, de los tubos (de la primera fase) que no presentaron crecimiento; con lo que, luego de seguir el procedimiento del punto 5.7.2, se determinó la CBM o CFM para todos los extractos de propóleos.

5.5. Análisis fitoquímico preliminar del extracto de propóleos

Se realizó el análisis fitoquímico preliminar de los tres extractos (propóleos de tres lugares), elegidos por el estudio preliminar de la actividad antimicrobiana. El propósito de éste análisis fue identificar los principales metabolitos secundarios que contienen los extractos en estudio y se efectuó utilizando el método de cromatografía en capa fina (CCF).

La CCF es un método cromatográfico frecuentemente utilizado en análisis preliminares de extractos vegetales, debido a que presenta varias ventajas tales como: bajo costo, rápido y es capaz de brindar información cualitativa y semi-cuantitativa.⁴¹ La técnica consta de una fase estacionaria, que generalmente es un gel de sílice dispuesto en forma de una capa delgada sobre una superficie plana (que puede ser aluminio o vidrio); y una fase móvil que corresponde a una mezcla de solventes.⁴²

Un parámetro característico de cada compuesto, es el valor del factor de retención (R_f) y se calcula mediante la **Ecuación (2)**. Donde la distancia recorrida por un compuesto está dada desde el lugar de siembra, hasta la mancha formada; y la distancia recorrida por la fase móvil está dada desde el lugar de siembra hasta el punto máximo donde llegó la fase móvil.⁴³

$$R_f = \frac{\text{Distancia recorrida por un compuesto}}{\text{Distancia recorrida por la fase móvil}} \quad \text{Ecuación (2)}$$

En el presente estudio, el análisis fitoquímico preliminar se realizó para evaluar la presencia de flavonoides, taninos, alcaloides, y terpenos; utilizando las fases móviles y reveladores, según se muestra en la **Tabla N° 16**.

Tabla N° 16 Identificación de metabolitos secundarios en los extractos etanólicos de propóleos, por TLC.

METABOLITOS SECUNDARIOS	FASE MÓVIL	REVELADOR
General	Acetato de etilo:Metanol:Agua (8:1.8:2)	Solucion etanólica de vainillina 1% y solución etanólica de ácido sulfúrico 5%
Flavonoides	<ul style="list-style-type: none"> • Acetato de etilo:Metanol:Agua (8:1.8:2) • Tolueno:Acetato de etilo (5:5) 	Cloruro de aluminio en etanol
Taninos	Metanol:Agua (8:2)	Cloruro férrico
Alcaloides	Acetato de etilo:Metanol:Agua (8:1.8:2)	Reactivo de Dragendorff
Terpenos	Tolueno:Acetato de etilo (5:5)	<ul style="list-style-type: none"> • Solucion etanólica de vainillina 1% y solución etanólica de ácido sulfúrico 5% • Reactivo de Liebermann

Fuente: Elaboración propia.

5.6. Identificación de los microorganismos

Las cepas patológicas que se obtuvieron del Hospital Honorio Delgado, fueron aisladas y caracterizadas en esta institución. Sin embargo, para asegurar la presencia de *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*, se realizó una nueva identificación de las mismas.

5.6.1. *Staphylococcus aureus*

5.6.1.1. Agar manitol salado

El agar manitol salado es un medio de cultivo diferencial y selectivo. Como fuente de nitrógeno presenta al extracto de carne y la pluripectona. Contiene una elevada concentración de cloruro de sodio que inhibe el crecimiento de la mayoría de bacterias. Además, presenta como indicador

de pH al rojo fenol, que en medio ácido se torna color amarillo y en medio básico cambia a color rojo. Su componente principal es el manitol que es la fuente de carbono. Existen bacterias que pueden fermentar al manitol y soportar la elevada concentración de cloruro de sodio.⁴⁴

El procedimiento realizado con este agar consistió en pesar 28g del medio deshidratado y suspenderlo en 250mL de agua. Seguidamente, se mezcló, se disolvió por medio de ebullición durante 1 minuto y se llevó a la autoclave para su esterilización (121°C, 15 minutos y 1.5atm.). Luego, se dejó enfriar (45°C) y se distribuyó el agar en placas Petri de vidrio estériles. Una vez que el agar gelificó en las placas, se sembró la muestra que contiene a las bacterias por medio de la técnica de estría. Finalmente, se incubó a 37°C durante 24 horas.⁴⁵

El manitol cuando es fermentado por ciertas bacterias, se provoca la formación de ácidos, disminuyendo el pH del medio. Esto altera al indicador de pH, provocando que el medio cambie a un color amarillo. Por otra parte, si la bacteria no puede fermentar el manitol el medio permanece rojo.⁴⁵

5.6.1.2. Tinción de Gram

La tinción de Gram es un procedimiento de identificación primario usado para determinar la capacidad de un microorganismo de retener al colorante primario (cristal violeta), luego de la adición del agente decolorante (etanol-acetona). Los microorganismos Gram-positivos retienen este colorante y los Gram-negativos se decoloran.⁴⁶

Las bacterias Gram-positivas tienen una pared celular compuesta por una capa gruesa de peptidoglicano, ácidos lipoteicoicos y ácidos teicoicos, por medio de estos componentes se produce la retención del cristal violeta, durante el proceso de decoloración. Por otro lado, las bacterias Gram-negativas presentan una delgada capa de peptidoglicano entre sus

membranas lipídicas interna y externa, debido a esto no pueden retener al cristal violeta en el proceso de decoloración.⁴⁷

El procedimiento de esta tinción se realizó de la siguiente manera: se utilizó un asa de Kolle, con la cual se preparó una suspensión de las bacterias en suero fisiológico sobre una lámina portaobjetos. A continuación, se secó la lámina al aire y se fijó la muestra en calor, pasando la lámina dos veces a través de la llama del mechero (sin sobrecalentar). Se colocó la lámina sobre un estante de tinción. Seguidamente, se inundó esta lamina con la solución de cristal violeta durante 1 minuto, luego se lavó suavemente con agua de grifo. De forma inmediata, se cubrió la lámina con la solución de lugol durante 1 minuto y se lavó suavemente con agua de grifo, esta solución de lugol actuó como mordiente haciendo que el cristal violeta se fije con mayor intensidad al peptidoglicano. Inmediatamente, se realizó el proceso de decoloración, para lo cual se cubrió la lámina con una solución de etanol-acetona y se agito suavemente durante 30 segundos, luego se lavó suavemente con agua del grifo. Se cubrió la superficie de la lámina con solución de safranina durante 1 minuto, luego se lavó suavemente con agua del grifo. Se dejó secar al aire. Finalmente, se usó un microscopio a un aumento de 100X, usando aceite de inmersión.⁴⁶

Las bacterias que se tornan purpura oscuro son Gram-positivos y lo que se tiñen de una coloración rojo o rosada son Gram-negativos.⁴⁶

5.6.1.3. Prueba de la catalasa

La enzima catalasa es producida por algunas bacterias. Esta enzima cataliza la degradación de peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno molecular.⁴⁴

El procedimiento para la realización de esta prueba fue el siguiente: por medio de un asa de Kolle, se colocó una colonia de la bacteria en una lámina portaobjetos, la cual contuvo 2-3 gotas de peróxido de hidrógeno al 3%.⁴⁶

La prueba de la catalasa es positiva cuando se observa la producción burbujas de gas en la gota, debido a la liberación del oxígeno.⁴⁶

5.6.1.4. Prueba de la coagulasa

Algunas bacterias presentan la enzima coagulasa, que provoca la coagulación del plasma mediante la conversión de fibrinógeno en fibrina.⁴⁴

Para la realización de esta prueba se colocó 1-2 gotas de plasma humano en una lámina portaobjetos. Seguidamente, se transfirió una colonia de la bacteria en estudio y se suspendió en la gota de plasma (por medio de un asa de Kolle). Finalmente, se agitó de forma suave y se esperó de 10-20 segundos.⁴⁶

Se considera que la prueba de la coagulasa es positiva cuando se produce la formación de grumos por acción de la coagulasa.⁴⁶

5.6.2. *Candida albicans*

5.6.2.1. Tinción de Gram

Los hongos poseen una membrana celular gruesa compuesta por: quitina, glucanos, y manoproteínas. Estos componentes les permiten a los hongos retener al colorante primario de la tinción de Gram (cristal violeta), adquiriendo un comportamiento de Gram-positivos. Cabe aclarar que el fundamento y procedimiento de la tinción de Gram se describe en el apartado 5.5.1.2.⁴⁸

5.6.2.2. Prueba del tubo germinativo

La prueba del tubo germinativo consiste en la inducción de excrecencia de hifas (tubos germinales), donde solo algunas levaduras son capaces de producir verdaderos tubos germinales.⁴⁹

El procedimiento de esta prueba consistió en colocar al microorganismo en un tubo con 0.5 mL de suero humano, utilizando un asa de Kolle. Seguidamente, se llevó a incubar a 37 °C durante 3 horas. Por último, se colocó 2-3 gotas del medio del tubo incubado en una lámina portaobjetos y se observó al microscopio con un aumento de 40X.³⁵

La prueba es positiva cuando aparecen prolongaciones tempranas de las células levaduriformes, producidas sin un estrechamiento en el punto de origen de la célula.³⁵

5.6.2.3. Asimilación de carbohidratos

La prueba de asimilación de carbohidratos determina la capacidad de una levadura de usar determinados carbohidratos como fuente de carbono.⁵⁰

Para la realización de esta prueba se usó caldo purpura de bromocresol, el cual consto de extracto de carne y peptonas (fuente de nitrógeno, carbohidratos y vitaminas), cloruro de sodio (mantener equilibrio osmótico) y el indicador de pH purpura de bromocresol. Este último en pH básico presenta un color purpura y en pH ácido un color amarillo. Además, a este caldo se le agregó el carbohidrato que se requiere evaluar (glucosa, lactosa, sacarosa, galactosa y maltosa).⁵¹

El procedimiento consistió en pesar 1.2g del medio deshidratado (caldo purpura de bromocresol), y se disolvió en 75 mL de agua. Seguidamente, se le agregó 0.5g del carbohidrato de prueba y se distribuyó

en tubos de ensayo. Se realizó en mismo procedimiento para los seis carbohidratos estudiados. Luego, se esterilizó en autoclave (121 °C, 15 minutos y 1.5 atm.). Finalmente, se sembraron las colonias de los microorganismos en cada tubo y se llevó a incubar a 37 °C por 48 horas.⁵¹

Si el microorganismo puede asimilar determinado carbohidrato, produce la formación de ácidos, provocando que el pH se vuelva ácido. Por lo tanto, el medio cambia de color a amarillo.⁵¹

5.7. Evaluación de la actividad antimicrobiana

En el esfuerzo de expandir el espectro de agentes antibacterianos provenientes de las plantas, se realizó la evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto de propóleos. Debido a que, se realizó un estudio preliminar de la actividad antimicrobiana de este extracto, se pudo discriminar a las bacterias con las cuales no hubo ningún efecto y el tipo de extracto con mejor actividad antimicrobiana, tal como se detalló en el apartado 5.4 (Estudio preliminar de la actividad antimicrobiana de los extractos de propóleos). La actividad antimicrobiana se estudió de forma cuantitativa mediante los métodos *in vitro* que se describen a continuación:

5.7.1. Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)

La concentración inhibitoria mínima, es definida como la menor concentración del antimicrobiano que inhibe el desarrollo *in vitro* de un microorganismo.⁵²

5.7.1.1. Método de dilución en caldo

Este método está basado en hallar al tubo donde no se apreció crecimiento bacteriano (sin turbidez). Este tubo indicó la mínima concentración del extracto de propóleos que se requiere para no producir

el desarrollo bacteriano. El procedimiento para la realización de este método se efectuó de la siguiente manera:⁵³

5.7.1.1.1. Preparación de la solución madre

Se preparó una solución madre del extracto etanólico de propóleos con una concentración de 250mg/mL. Para la emulsificación del extracto con el agua destilada se utilizó al tween 20 al 5%, el cual es un surfactante hidrofílico que facilitó la disolución del extracto en el agua. Este procedimiento se realizó para cada uno de los extractos de los departamentos de Arequipa, Cusco y Tacna.

5.7.1.1.2. Preparación del inóculo

La preparación del inóculo se realizó con un asa de Kolle estéril, con la cual se colocó de 4 a 5 colonias de las cepas en estudio, que fueron aisladas en un medio de aislamiento primario (agar Mueller-Hinton), en un tubo con 10 mL de caldo BHI. El inóculo contuvo una concentración aproximada de 10^8 UFC/mL, para lo cual se utilizó el patrón 0.5 de la escala de McFarland para ajustar la cantidad de UFC/mL. La preparación de esta escala se describió en el **Anexo 8**. Finalmente, se procedió a realizar una dilución 1/100 del inóculo y se obtuvo una solución 10^6 UFC/mL, es decir se hizo una dilución tomando 0.1 mL del inóculo de 10^8 UFC/mL y se agregó 9.9 mL de caldo peptonado. Este procedimiento se repitió para cada microorganismo en estudio.

5.7.1.1.3. Preparación de las diluciones

Las diluciones, para la evaluación del efecto antimicrobiano de los extractos etanólicos de propóleos, se realizaron como se muestra en la **Tabla N° 17**.

Tabla N° 17 Esquema de diluciones para evaluar el efecto antimicrobiano de los extractos etanólicos de propóleos.

Soluciones	Tubo										Control +
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Inóculo 10⁶ (mL)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Extracto (250mg/mL)	1.0	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0.0
Caldo BHI (mL)	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0
Vol. Final (mL)	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
Cc. Final (mg/mL)	125.0	112.5	100.0	87.5	75.0	62.5	50.0	37.5	25.0	12.5	0.0

Fuente: Elaboración propia

Cada tubo presentó su control negativo, el cual constó de la correspondiente concentración del extracto y la cantidad de inóculo fue reemplazada por caldo BHI. Este control fue necesario, ya que el extracto solo posee cierto color, que dificultó observar la ausencia o presencia de microorganismos (turbidez). Luego, los tubos fueron incubados a 37°C durante 24 horas para las bacterias, en el caso de *Candida albicans* se incubó por 48 horas a temperatura ambiente (aprox. 20°C). Este procedimiento se realizó para cada cepa patológica estudiada. Luego de la incubación, se buscó el tubo a partir del cual no hubo turbidez (no hubo crecimiento), este tubo representó a la CIM, ya que indicó la concentración mínima del extracto de propóleos que inhibió el crecimiento de la cepa patológica estudiada.

5.7.2. Concentración Bactericida o Fungicida Mínima (CBM o CFM)

La concentración bactericida o fungicida mínima, según sea el caso, es la concentración que es capaz de completar la acción bactericida o fungicida del antimicrobiano. Es definida como la concentración más baja en la cual no se ha presentado crecimiento del microorganismo después del subcultivo en un medio fresco. Esta es la concentración que puede generar $\geq 99.9\%$ de mortalidad de las células microbianas iniciales.⁵⁴

El método de la CBM/CFM consistió en hacer un subcultivo de los tubos inferiores a la CIM, en placas que contienen agar Mueller Hinton. Luego se incubó a 37°C por 24 horas para las bacterias, en el caso de *Candida albicans* se incubó por 48 horas a temperatura ambiente (aprox. 20°C); y se observó el crecimiento bacteriano en las placas. Por último, se procedió a buscar el punto de ruptura en las placas donde hubo crecimiento y donde no hubo crecimiento.⁵²

Se trata de sembrar en medio sólido de los tubos inferiores a la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM), el cual demostrará cual es la concentración mínima capaz de matar totalmente la bacteria. La placa donde se sembró la concentración más baja del extracto de propóleos donde no hubo crecimiento de bacterias u hongos, indicó la CBM o CFM.⁵⁴ El esquema gráfico de la determinación del CIM y el CBM/CFM, se observa en la **Figura N° 13**.

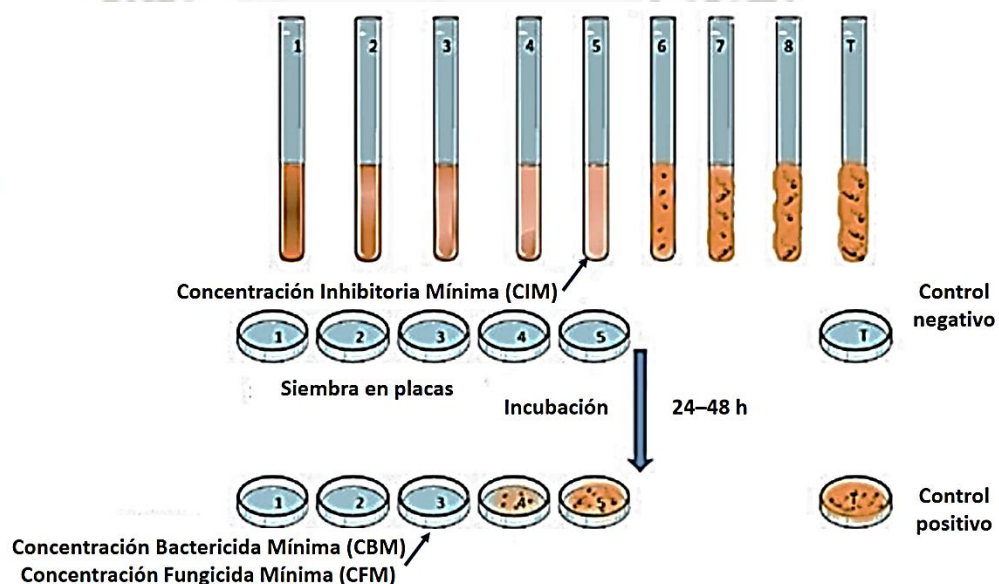


Figura N° 13 Esquema de la determinación de CIM, CBM/CFM.⁵⁴

5.7.3. Sensibilidad antimicrobiana

La sensibilidad antimicrobiana del extracto de propóleos frente a los microorganismos en estudio se evaluó mediante el método de difusión de discos (método de Kirby-Bauer). Este método se basa en la inoculación de una

cantidad estandarizada de bacterias sobre la superficie del agar, sobre el cual se colocan discos de papel impregnados con concentraciones conocidas de los extractos, antibióticos y/o muestras. Este difundirá desde el papel hacia el agar de forma radial.⁵⁵

Este método se efectuó de la siguiente forma: se procedió a elaborar discos de papel filtro Whatman N°4 de aproximadamente 6mm de diámetro, con un perforador, los cuales fueron almacenados en un frasco y esterilizados en la autoclave (121 °C, 15 min., 1.5 atm.). Una vez esterilizados y con la ayuda de una micropipeta los diferentes discos fueron impregnados con las diferentes concentraciones de los extractos de los tres departamentos, para lo cual se utilizó la solución madre de 250mg/mL de los extractos de propóleos.⁵⁶

A continuación, se procedió a preparar placas con agar Mueller Hinton, las cuales fueron sometidas a un control de esterilidad por incubación a 37°C durante 24 horas. Luego con los inóculos de 10⁶ UFC/mL de los microorganismos en estudio, se sembró usando hisopos estériles en forma horizontal de derecha a izquierda, en forma vertical de arriba hacia abajo, en sentido de las agujas del reloj y en sentido contrario a las agujas del reloj, teniendo la precaución de no dejar ningún espacio sin inóculo, se dejó reposar por 5 min. Una vez realizada la siembra de los microorganismos, se dividió la placa en 3 partes iguales en las que se colocó los discos impregnados con el extracto de propóleos. Por último, se dejó secar por un espacio de 30 min antes de ser llevadas a incubación por 24 horas a 37°C. En el caso de *Candida albicans* se incubó por 48 horas a temperatura ambiente (aprox. 20°C). Los resultados se expresan con el diámetro (mm) de los halos de inhibición que se forman en presencia del extracto de propóleos.⁵⁷

5.8. Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron evaluados utilizando los softwares Statgraphics Centurion XVI.I y M.S. Excel 2016; con los cuales se realizó los respectivos análisis estadísticos (diferencial y descriptivo). El nivel de confianza fue de 95%.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Análisis del propóleo

1.1. Propiedades organolépticas

La **Tabla N° 18** muestra los resultados obtenidos del análisis sensorial realizado en el laboratorio SERVILAB, cuyos informes de ensayo se muestran en los **anexos 19, 20 y 21**.

Los propóleos utilizados en el presente estudio (de Arequipa, Cusco y Tacna), presentaron un olor resinoso; con un color que varía entre pardo, pardo verdoso y pardo oscuro; tuvieron un aspecto de trozos semiduros y; el propóleo de Cusco fue insípido, mientras que el de Arequipa tuvo un sabor amargo y el de Tacna un sabor ligeramente amargo; éstas características organolépticas, se asemejan a las encontradas por Damiani *et al.*⁵⁸ y Chaillou *et al.*⁵⁹, quienes estudiaron propóleos de distintos lugares de Argentina, por lo que se podría decir que las propiedades organolépticas descritas son propias de los propóleos.

Tabla N° 18 *Propiedades organolépticas de los propóleos*

ANÁLISIS	PROPÓLEOS DE:		
	Arequipa	Cusco	Tacna
Olor	Aromático	Resinoso	Resinosos
Color	Pardo	Pardo oscuro	Pardo verdoso
Sabor	Amargo	Insípido	Ligeramente amargo
Aspecto	Trozos semiduros	Trozos semiduros	Trozos semiduros

Fuente: Elaboración propia.

1.2. Determinación de humedad, cenizas y grasas

Los propóleos en estudio, presentan porcentajes de humedad, cenizas y grasas cercanos entre sí (**Tabla N° 19**); teniendo una humedad de 3.92%, 4.66% de cenizas y 14.72% de grasas el propóleos de Arequipa; mientras que el de Cusco presentó 3.74% de humedad, 1.63% de cenizas y 41.09% de grasas; y el de Tacna tuvo 3.44% de humedad, 1.90% de cenizas y 13.10% de grasas; Todos estos valores son cercanos a los hallados por Palomino *et al.*⁶⁰ y Lozina *et al.*⁶¹

Tabla N° 19 *determinación de humedad, cenizas y grasas de los propóleos.*

ANÁLISIS	PROPÓLEOS DE:		
	Arequipa	Cusco	Tacna
Humedad (%)	3.92	3.74	3.44
Cenizas (%)	4.66	1.63	1.90
Grasas (%)	14.72	41.09	13.10

Fuente: Elaboración propia.

2. Obtención de extractos de propóleos

Como se observó en metodología, el proceso de extracción se realizó utilizando tres solventes (etanol, cloroformo y hexano). Inicialmente se realizó la extracción para el estudio preliminar de la actividad antimicrobiana, de los extractos. Posteriormente, y conforme a los resultados de ese estudio, se realizó el proceso de extracción con etanol, extractos que se observan en la **Figura N° 14**.



Figura N° 14 *Extractos etanólicos de propóleos de Arequipa, Cusco y Tacna (de izquierda a derecha)*

Fuente: Elaboración propia.

2.1. Determinación del rendimiento de extracción

La **Tabla N° 20** muestra los datos obtenidos para la determinación del porcentaje de rendimiento de extracción de los tres propóleos con los solventes evaluados. El porcentaje de rendimiento de extracción corresponde al promedio de tres repeticiones

Se observa que la extracción con etanol, presenta el mayor porcentaje de rendimiento para los tres propóleos (60.66%, 62.70 y 56.48% para los propóleos de Arequipa, Cusco y Tacna, respectivamente), seguido por la extracción con cloroformo que presenta porcentajes de rendimiento de 17.73% - 23.35% y finalmente, con hexano se tuvo el menor porcentaje de rendimiento (5.01% - 6.31%). Existen referencias bibliográficas en las que indican que se tiene un mayor rendimiento de extracción, utilizando solventes de baja polaridad (hexano)⁶⁰; sin embargo, éstos estudios utilizaron un equipo de Soxhlet; mientras que, en el presente estudio, la extracción se realizó por percolación en frío, con los tres solventes.

Tabla N° 20 Determinación del porcentaje de rendimiento de los extractos de propóleos.

PROPÓLEOS DE:	SOLVENTE	PROMEDIO DE RENDIMIENTO (%)	D.S.	C.V. (%)
Arequipa	Etanol	60.66	0.63	1.04
	Cloroformo	23.35	0.43	1.85
	Hexano	6.31	0.14	2.20
Cusco	Etanol	62.70	0.39	0.62
	Cloroformo	21.72	0.38	1.76
	Hexano	5.14	0.41	7.89
Tacna	Etanol	56.48	0.05	0.09
	Cloroformo	17.73	0.20	1.15
	Hexano	5.01	0.41	8.12

Fuente: Elaboración propia.

3. Estudio preliminar de la actividad antimicrobiana de los extractos de propóleos

3.1. Determinación de la sensibilidad microbiana por el método “hoyo-placa”

La **Tabla N° 21** muestra los resultados preliminares de la sensibilidad que presentan los microorganismos frente a los extractos de propóleos. Se observa que los microorganismos Gram-negativos (*Escherichia Coli* y *Pseudomona aeruginosa*), presentan una completa resistencia frente a todos los extractos; este hallazgo es reportado también por diversas investigaciones que señalan que los extractos de propóleos presentan mayor actividad antimicrobiana frente a Gram-negativos que los gram-positivos^{19,62}.

Además, es evidente la diferencia del diámetro de los halos obtenidos con los extractos etanólicos y los otros dos extractos (clorofórmico y hexánico); con lo que se deduce que, aparentemente los extractos alcohólicos presentan una mayor actividad antimicrobiana.

Tabla N° 21 Resultados preliminares de la sensibilidad microbiana a los extractos de propóleos, por el método “hoyo-placa”.

Propóleos de:	Extracto	Halo de inhibición (mm)			
		<i>Escherichia Coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	<i>Candida albicans</i>
Arequipa	Etanólico	CT	16	CT	24
	Clorofórmico	CT	10	CT	13
	Hexánico	CT	9	CT	11
Cusco	Etanólico	CT	20	CT	27
	Clorofórmico	CT	10	CT	12
	Hexánico	CT	8	CT	10
Tacna	Etanólico	CT	17	CT	21
	Clorofórmico	CT	10	CT	13
	Hexánico	CT	9	CT	11

CT: Crecimiento total.

Fuente: Elaboración propia.

3.2. Determinación de la concentración bactericida o fungicida mínima

Luego de obtener los resultados anteriores; se procedió a determinar, de forma preliminar, las CBM o CFM para todos los extractos. La **Tabla N° 22** muestra los valores hallados, utilizando los microorganismos sensibles a los extractos de propóleos. Evidentemente se observa que los extractos etanólicos presentan mayor

actividad antimicrobiana (comparado con los extractos clorofórmicos y hexánicos), datos que confirma el hallazgo realizado en el punto anterior. Además, éste hallazgo está respaldado por diversas investigaciones, en las que refieren el uso de extractos etanólicos de propóleos para evaluar su actividad antimicrobiana.^{19,63,64}

Tabla N° 22 Resultados preliminares de la CBM o CFM de los extractos de propóleos.

Extractos	Propóleos de:	Concentración de extracto (mg/mL)	
		<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Candida albicans</i>
Etanólico	Arequipa	75	75
	Cusco	62.5	75
	Tacna	75	100
Clorofórmico	Arequipa	112.5	112.5
	Cusco	112.5	112.5
	Tacna	125	125
Hexánico	Arequipa	>250	>250
	Cusco	>250	>250
	Tacna	>250	>250

Fuente: Elaboración propia.

Por lo tanto, considerando los resultados del estudio preliminar de la actividad antimicrobiana de los extractos de propóleos, se decidió continuar con el estudio utilizando los extractos etanólicos y solamente los microorganismos *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*.

4. Análisis fitoquímico preliminar del extracto de propóleos

4.1. Perfil de cromatografía en capa fina

La **Figura N° 15** muestra el perfil de cromatografía en capa fina de los extractos etanólicos de propóleos utilizados en el presente estudio. Para el revelado de la placa cromatográfica, se utilizó las soluciones etanólicas de vainillina y ácido sulfúrico; éstos constituyen un reactivo cromógeno, no-específico, frecuentemente utilizado en análisis de este tipo y sirve para detectar alcoholes superiores, fenoles, esteroides, terpenos y otros, según señala Killacky *et al.*⁶⁵ Por lo que, observando el perfil de CCF de los extractos de propóleos, se deduce la presencia de diversos metabolitos secundarios. Además, los distintos valores de R_f y los colores de las

“manchas” (**Tabla N° 23**), evidencian ciertas diferencias en la composición de los tres extractos de propóleos.

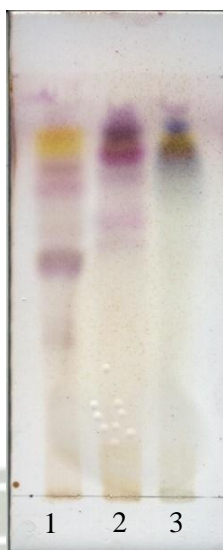


Figura N° 15 Perfiles de CCF de los extractos etanólicos de propóleos de Arequipa (1), Cusco (2) y Tacna (3).

Fuente: elaboración propia.

Tabla N° 23 Valores de Rf de los compuestos detectados en el perfil de CCF de los extractos etanólicos de propóleos.

Rf	PROPÓLEOS DE:		
	AREQUIPA	CUSCO	TACNA
0,38	Morado	-	-
0,56	Morado	-	-
0,61	-	Morado	-
0,65	-	Rosa	-
0,74	Rosa	-	-
0,76	-	Morado	-
0,77	-	-	Azul oscuro
0,78	Morado oscuro	-	-
0,82	-	Violeta	Amarillo
0,84	Amarillo	Amarillo	Amarillo
0,87	Naranja	Morado	Azul intenso
0,91	-	Morado	Morado

Fuente: Elaboración propia.

4.2. Detección de flavonoides

Según señala Wagner & Bladt⁶⁶, una forma de detectar la presencia de flavonoides es el uso de luz UV; en el que, dependiendo del tipo de estructura, los flavonoides muestran una fluorescencia amarilla oscura, verde o azul. Por lo que, la placa cromatográfica (obtenido con la fase móvil del perfil de CCF de los extractos),

se sometió a una lámpara de luz UV de 360nm y tal como se observa en la **Figura N° 16**, se observa la presencia de dos “manchas” fluorescentes de color verde azulado y amarillo; lo que indica la presencia de flavonoides en los extractos etanólicos de propóleos. Además, la **Tabla N° 24** muestra los valores de Rf de las zonas observadas.



Figura N° 16 Placa cromatográfica de los extractos etanólicos de propóleos de Arequipa (1), Cusco (2) y Tacna (3). Observado con luz UV de 360nm

Fuente: elaboración propia.

Tabla N° 24 Valores de Rf de las machas fluorescentes detectados, del perfil cromatográfico de los extractos etanólicos de propóleos

Rf	Propóleos de: Arequipa	Cusco	Tacna
0,87	Verde azulado	Verde azulado	Verde azulado
0,92	Amarillo	Amarillo	Amarillo

Fuente: Elaboración propia.

Por otro lado, se evaluó la presencia de flavonoides utilizando como fase móvil la mezcla de tolueno/acetato de etilo (5:5); y como revelador, una solución etanólica de cloruro de aluminio. La diferencia de éste reactivo con el revelador utilizado en el perfil de CCF de los extractos, es que el cloruro de aluminio es específico para flavonoides, especialmente del tipo de flavonas y flavonoles,⁶⁷ es útil en éste tipo de análisis⁶⁸ e incluso es utilizado para la determinación del contenido de este metabolito secundario.⁶⁹

La **Figura N° 17** muestra la placa cromatográfica obtenida con este revelador y llevado a la luz UV de 360nm; así mismo, la **Tabla N° 25** muestra los valores

de Rf. Se observa el desarrollo de coloraciones entre verde, morado, azul, amarillo y celeste, que confirman la presencia de flavonoides en los extractos etanólicos de propóleos; incluso, se podría afirmar que los tipos de éste metabolito secundario son flavonas y flavonoles.⁶⁷



Figura N° 17 Placa cromatográfica de los extractos etanólicos de propóleos de Arequipa (1), Cusco (2) y Tacna (3); para la detección de flavonoides. Observado con luz UV de 360nm

Fuente: elaboración propia.

Tabla N° 25 Valores de Rf de las machas fluorescentes detectados en los extractos etanólicos de propóleos, para la detección de flavonoides.

Rf	PROPÓLEOS DE:		
	AREQUIPA	CUSCO	TACNA
0,03	Verde	Verde	-
0,06	Morado	Morado	-
0,12	Azul	Azul	-
0,20	Amarillo	Amarillo	-
0,37	Amarillo	Amarillo	Amarillo
0,45	Celeste	-	Celeste
0,56	-	-	Amarillo
0,65	Celeste	-	-
0,70	-	-	Amarillo
0,82	Celeste	-	-

Fuente: Elaboración propia.

Además, la presencia de flavonoides en los extractos etanólicos de propóleos utilizados en el presente estudio, es respaldado por otros estudios que refieren un

contenido importante de este tipo de metabolito secundario, tal como lo señalan Chang *et al.*,⁶⁹ quienes analizaron propóleos de Taiwán, Brasil y China, y reportaron la presencia de flavonas y flavonoles.

4.3. Detección de taninos

La presencia de taninos fue evaluada utilizando como revelador una solución de cloruro férrico al 5%, éste reactivo fue utilizado también por Hashimoto *et al.*⁷⁰ La **Figura N° 18** muestra la reacción positiva para taninos (color azul), por lo que se deduce que los extractos etanólicos de los propóleos contienen taninos en su composición; además, el valor del Rf hallado fue 0.82. Por otro lado, la presencia de taninos en extractos alcohólicos de propóleos, fue reportando también por Kalia *et al.*⁷¹



Figura N° 18 Placa cromatográfica de los extractos etanólicos de propóleos de Arequipa (1), Cusco (2) y Tacna (3); para la detección de taninos.

Fuente: Elaboración propia.

4.4. Detección de alcaloides

La **Figura N° 19** muestra la placa cromatográfica de los extractos etanólicos de propóleos utilizados en el presente estudio. La presencia de alcaloides con el reactivo de Dragendorff resulta una coloración marrón o naranja-marrón⁷²; por lo que en la mencionada figura se observa que la reacción fue negativo para este metabolito secundario. Sin embargo, Kalia *et al.*⁷¹ señalan la presencia de alcaloides en propóleos de India, ésta diferencia probablemente se debe a la diferencia biológica que podría existir entre los materiales vegetales que utilizan las abejas para producir el propóleos.

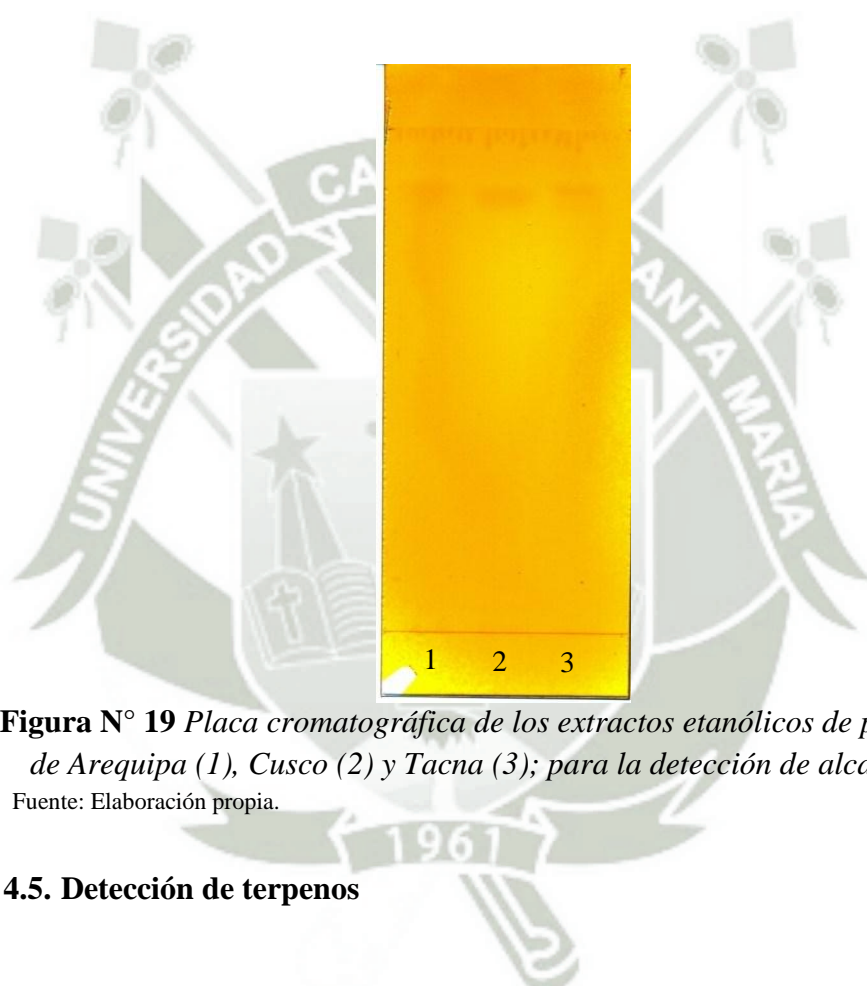


Figura N° 19 Placa cromatográfica de los extractos etanólicos de propóleos de Arequipa (1), Cusco (2) y Tacna (3); para la detección de alcaloides.

Fuente: Elaboración propia.

4.5. Detección de terpenos

La **Figura N° 20** muestra la placa cromatográfica de los extractos etanólicos de los propóleos, utilizando como revelador las soluciones de vainillina y ácido sulfúrico. Además, la **Tabla N° 26** muestra los valores de Rf de todos los compuestos detectados. Como se mencionó anteriormente, el revelador es un reactivo no-específico⁶⁵; por lo que, ésta placa podría indicar la presencia de varios grupos de compuestos, entre ellos los terpenos.

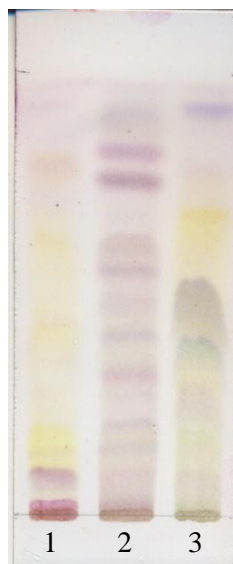


Figura N° 20 Placa cromatográfica de los extractos etanólicos de propóleos de Arequipa (1), Cusco (2) y Tacna (3); para la detección de terpenos.

Fuente: Elaboración propia.

Tabla N° 26 Valores de Rf de las machas detectadas en los extractos etanólicos de propóleos, para la detección de terpenos.

Rf	PROPÓLEOS DE:		
	AREQUIPA	CUSCO	TACNA
0,03	Rosado	Rosado	-
0,09	Rosado	Rosado	Rosado
0,13	Amarillo	-	-
0,15	-	Azul	-
0,18	Amarillo	-	Amarillo
0,20	-	Rosado	-
0,27	-	-	Rosado
0,32	-	Rosado	-
0,40	Amarillo	Azul	Azul
0,50	-	Rosado	Rosado
0,55	-	Rosado	-
0,61	Amarillo	Rosado	-
0,68	-	-	Amarillo
0,77	-	Rosado	-
0,79	Naranja	-	Naranja
0,82	-	Rosado	-
0,92	Rosado	Rosado	Rosado

Fuente: Elaboración propia.

Por lo descrito en el párrafo anterior, se realizó también una placa cromatográfica con el reactivo de Liebermann, como revelador. Y según indica Wagner & Blatt,⁷³ la aparición de zonas de color rosado, indica la reacción positiva

para terpenos. La **Figura N° 21** muestra la presencia de este metabolito secundario en los extractos estudiados. Además, se observa que el extracto de propóleos de Cusco, presenta una mayor cantidad de terpenos (mayor intensidad del color de las manchas). Por otro lado, diversos estudios señalan que los terpenos son uno de los principales grupos de compuestos que presentan los propóleos⁷⁴; es así que los estudios realizados por: Trusheva *et al.*⁷⁵, Bankova *et al.*⁷⁶, Popova *et al.*⁶⁴, entre otros, reportan la presencia de estructuras monoterpénicas, sesquiterpénicas, diterpénicas y triterpénicas en propóleos de varios lugares de origen.

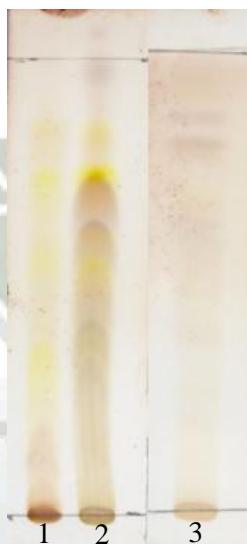


Figura N° 21 Placa cromatográfica de los extractos etanólicos de propóleos de Arequipa (1), Cusco (2) y Tacna (3); para la detección de terpenos, con reactivo de Liebermann.

Fuente: Elaboración propia.

5. Identificación de los microorganismos

5.1. *Staphylococcus aureus*

Las 10 cepas patológicas que indican la presencia de *Staphylococcus aureus*, fueron evaluadas con el fin de asegurar la presencia de estas bacterias. Los resultados obtenidos se describen a continuación:

5.1.1. Agar manitol salado

Luego del proceso de incubación, los agares manitol salado, se observó el desarrollo de colonias amarillas y el medio se tornó del mismo color, como

se aprecia en la **Figura N° 22**. Las bacterias estudiadas lograron soportar las altas concentraciones de cloruro de sodio. Además, la aparición del color amarillo indicó que estas bacterias fueron capaces de fermentar el manitol del medio, lo que probablemente produjo la formación de ácidos que hicieron disminuir el pH, lo que provocó el cambio de color del indicador de pH (de rojo a amarillo).

Según referencias bibliográficas, las bacterias patógenas del género *Staphylococcus* pueden resistir altas concentraciones de cloruro de sodio.⁴⁵ Además, se señala que el *Staphylococcus aureus* es una bacteria que fermenta al manitol; por lo tanto, forma colonias amarillas en agar manitol salado.⁷⁷

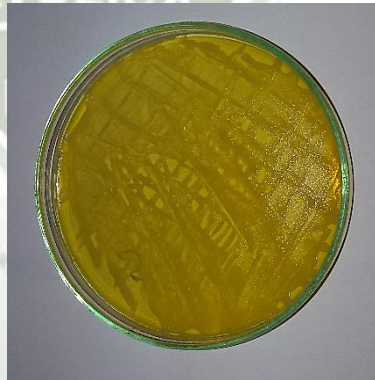


Figura N° 22 Agar Manitol Salado: Colonias amarillas y fermentación del manitol.

Fuente: Elaboración propia

5.1.2. Tinción de Gram

Mediante la tinción de Gram se observó la presencia de cocos en forma de racimos (estafilococos). Estos cocos presentaron una coloración violeta; por lo tanto, estas bacterias fueron Gram-positivas (**Figura N° 23**). Estas bacterias se tiñeron de violeta debido a su estructura, ya que presentaron una capa gruesa de peptidoglicano, la cual retuvo al colorante primario (cristal violeta), evitando que este colorante se desprendiera en el proceso de decoloración. En la literatura se ha descrito al *Staphylococcus aureus* como una bacteria Gram-positiva, que presenta forma de cocos agrupados como racimos (estafilococos).⁷⁸

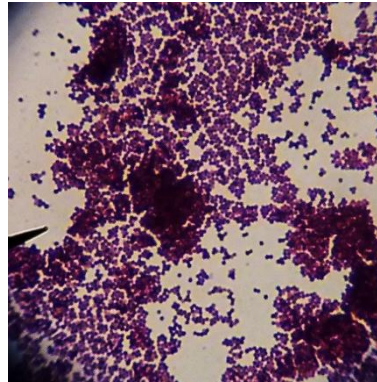


Figura N° 23 Tinción de Gram:
estafilococos Gram-positivos.

Fuente: Elaboración propia

5.1.3. Prueba de la catalasa

En la realización de la prueba de la catalasa, se observó la formación de burbujas, cuando las bacterias estuvieron en contacto con el peróxido de hidrógeno, tal como se muestra en la **Figura N° 24**. Estos resultados demostraron que las bacterias en estudio presentan la enzima catalasa.

Existe información científica que ha referido que la prueba de la catalasa permite distinguir los *Streptococcus* de los *Staphylococcus*, ya que estos últimos tienen catalasa. Por lo tanto, el *Staphylococcus aureus* es una bacteria que produce catalasa.⁷⁹



Figura N° 24 Prueba de la catalasa: positiva.

Fuente: Elaboración propia

5.1.3.1. Prueba de la coagulasa

Las bacterias sometidas a la prueba de la coagulasa, ocasionaron la formación de grumos, en contacto con el plasma humano. Esta respuesta se observa en la **Figura N° 25**. Esto significa que las bacterias estudiadas tuvieron la presencia de la enzima coagulasa, ya que convirtieron el fibrinógeno en fibrina, formando unos grumos o coágulos. De acuerdo a información

encontrada en la literatura, la prueba de la coagulasa permite distinguir el *S. epidermidis* del *Staphylococcus aureus*, ya que este último presenta coagulasa.⁸⁰



Figura N° 25 Prueba de la coagulasa: positiva.

Fuente: Elaboración propia

Los resultados obtenidos permitieron corroborar la presencia de *Staphylococcus aureus* en las cepas patológicas obtenidas. Lo que permitió que puedan ser utilizadas para evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos de propóleos.

5.2. *Candida albicans*

5.2.1. Tinción de Gram

Los microorganismos tratados con la tinción de Gram, mostraron la presencia de células esféricas, grandes y de coloración violeta (**Figura N° 26**). Esta coloración indicó que son microorganismos Gram-positivos, los cuales poseen una pared celular gruesa que evita que el cristal violeta se desprenda en el proceso de decoloración con alcohol-acetona.

Diversos estudios han manifestado que los hongos con la tinción de Gram pueden adquirir una tonalidad violeta, presentando un comportamiento similar a las Gram-positivas. La *Candida albicans* se encuentra en este grupo; por lo tanto, tras la tinción de Gram, exhibe células grandes, esféricas y Gram-positivas.^{48,81}

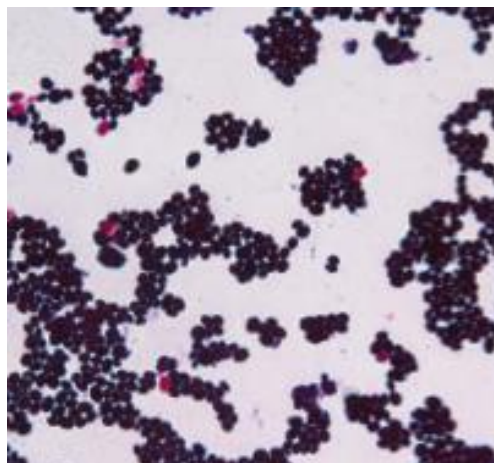


Figura N° 26 Tinción de Gram: células grandes, esféricas y Gram-positivas.

Fuente: Elaboración propia

5.2.2. Prueba del tubo germinativo

Los microorganismos sometidos a la prueba del tubo germinativo, mostraron en el microscopio prolongaciones provenientes de la célula levaduriforme (excrecencias de hifas). Estas prolongaciones se observan en la **Figura N° 27**. La literatura señala que la *Candida albicans* produce tubos germinales verdaderos, a comparación con otras levaduras del mismo género.⁴⁹

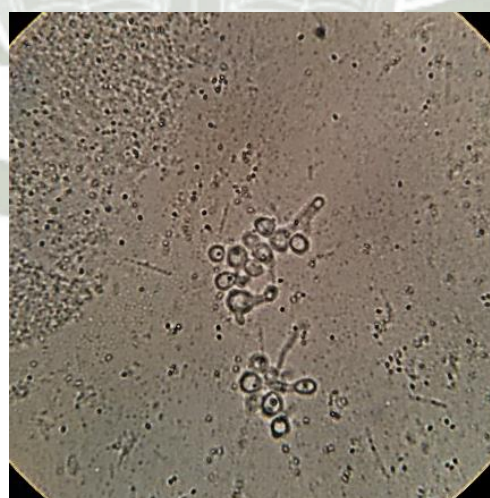


Figura N° 27 Prueba del tubo germinativo: excrecencias de hifas

Fuente: Elaboración propia

5.2.3. Prueba de asimilación de carbohidratos

En la prueba de asimilación de carbohidratos, se observó que los microorganismos asimilaron los carbohidratos: glucosa, sacarosa, galactosa y maltosa. Por otro lado, los carbohidratos: lactosa y rafinosa no fueron asimilados, como se muestra en la **Figura N° 28**.

Esta prueba ha sido descrita en la literatura como una forma de identificar definitivamente a la *Candida albicans*, la cual puede asimilar a la glucosa, maltosa, sacarosa y galactosa. Sin embargo, esta levadura no puede asimilar a la lactosa.⁵⁰

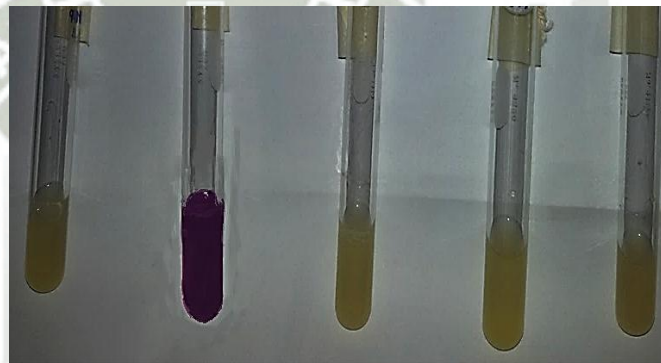


Figura N° 28 Prueba de la asimilación de carbohidratos: glucosa (+), lactosa (-), sacarosa (+), galactosa (+) y maltosa (+).

Fuente: Elaboración propia

Con los resultados obtenidos se pudo confirmar la presencia de *Candida albicans* en las cepas patológicas obtenidas. Pudiendo ser utilizadas para evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos de propóleos.

6. Evaluación de la actividad antimicrobiana

Luego de la obtención y caracterización de extracto de propóleos, se realizó la evaluación de la actividad antimicrobiana. En el estudio preliminar se demostró que el extracto etanólico solo tuvo efecto antimicrobiano sobre el *Staphylococcus aureus* (Gram-positivo) y la *Candida albicans* (hongo), mas no mostró ningún efecto sobre la *Escherichia Coli* y la *Pseudomona aeruginosa* (Gram-negativa). Existe información

en la literatura donde se indica que el propóleo presenta mayor actividad antimicrobiana en Gram-positivas y hongos que sobre Gram-negativas.^{63,82} Posiblemente, esto se deba a que las bacterias Gram-negativas presentan una pared celular delgada, pero que está rodeada por una capa de lipopolisacáridos que impide la entrada de ciertos agentes antimicrobianos.⁸³

6.1. Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)

6.1.1. *Staphylococcus aureus*

Los extractos etanólicos de propóleos de los departamentos de Arequipa, Cusco y Tacna mostraron que poseen actividad antimicrobiana sobre las cepas de *Staphylococcus aureus*, tanto para la cepa ATCC como para las cepas patológicas. Las concentraciones inhibitorias mínimas fueron 83.0 ± 10.1 , 64.8 ± 5.1 y 86.4 ± 8.8 mg/mL; para los extractos obtenidos de los departamentos de Arequipa, Cusco y Tacna; respectivamente. Estos resultados se muestran en la **Figura N° 29**. En la investigación realizada por Grange y Davey encontraron que el extracto etanólico de propóleos presenta actividad antimicrobiana contra bacterias Gram-positivas y una actividad limitada contra bacterias Gram-negativas, esta actividad antimicrobiana lo atribuyen al alto contenido de flavonoides del extracto etanólico de propóleos que obtuvieron de la ciudad de Lyon en Francia.⁶² Además, existe un estudio donde se indicó que la CIM del propóleos frente al *Staphylococcus aureus* fue de 10 mg/mL, corroborando el potencial antimicrobiano de este producto.¹³

Se realizó un análisis de varianza de una sola vía (One-Way ANOVA), con el cual se halló que existe diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre las CIMs de los extractos de cada departamento. Debido a esto, se hizo la prueba de Tukey que mostró que la CIM para el extracto de Arequipa y Tacna son estadísticamente similares. Se pudo observar que el extracto con el propóleos obtenido de Cusco, presenta una mayor actividad antimicrobiana. Esto podría deberse a que el propóleos obtenido de Cusco presentó una mayor

cantidad de terpenos (**Figura N° 21**), ya que existen investigaciones que señalan que los terpenos presentan actividad antimicrobiana.⁸⁴

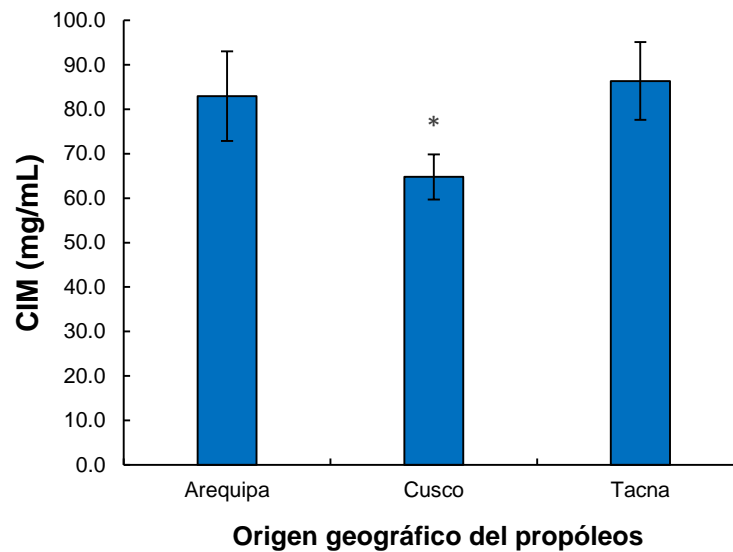


Figura N° 29 Concentración inhibitoria mínima del extracto etanólico de propóleos de los departamentos (Arequipa, Cusco y Tacna) frente a *Staphylococcus aureus*. Los valores representan el promedio $\pm \sigma$. * ($p < 0.05$). ANOVA seguido de la prueba de Tukey
Fuente: Elaboración propia

6.1.2. *Candida albicans*

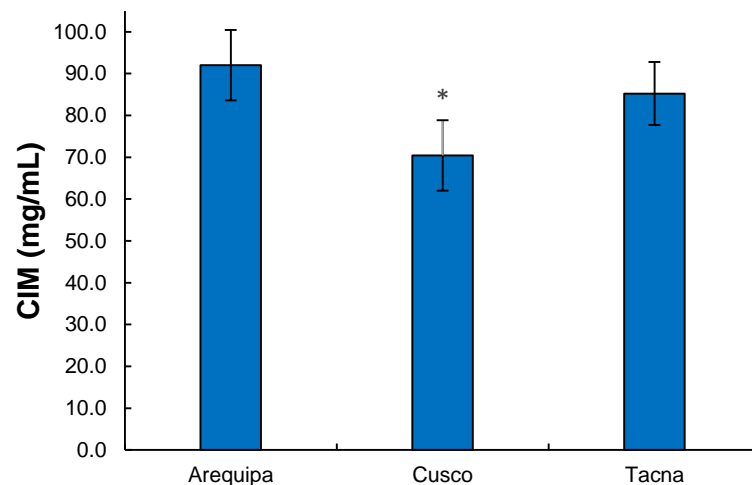
Los extractos etanólicos de propóleos procedentes de Arequipa, Cusco y Tacna; presentaron efecto antimicrobiano contra la *Candida albicans*. Las concentraciones inhibitorias mínimas de los extractos de propóleos fueron 92.0 ± 8.4 , 70.5 ± 8.4 y 85.2 ± 7.5 mg/mL; para los extractos obtenidos de los departamentos de Arequipa, Cusco y Tacna; respectivamente (**Figura N° 30**).

Se han reportado diversos estudios que indican que el propóleos presenta actividad antimicrobiana sobre la *Candida albicans*.^{85,86} En la investigación realizada por León *et al.*, se evaluó el extracto etanólico de propóleos de Oxapampa cuya CIM fue 12mg/mL,⁸⁷ de acuerdo a estos resultados se podría decir que la procedencia del propóleos está muy relacionada con su actividad antimicrobiana. De acuerdo con la investigación realizada por Takaisi y Schilcher, el propóleos previene la división celular de

los hongos y también descompone su pared celular y su citoplasma, de forma similar a la acción de algunos antifúngicos.⁸⁸

Por otra parte, el análisis estadístico de varianza de una sola vía, con el cual se demostró que había diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre las CIMs de los extractos de cada departamento frente a la *Candida albicans*. Además, se realizó una prueba de Tukey que indicó que no existía diferencia significativa entre los extractos etanólicos de propóleos obtenidos de Arequipa y Tacna.

En cuanto al extracto de propóleos de Cusco, presentó una menor CIM con respecto a los otros extractos, de manera similar a lo ocurrido con el *Staphylococcus aureus*. Este resultado también podría estar atribuido a la mayor cantidad de terpenos en el propóleos de Cusco, ya que se han reportado investigaciones que indican la actividad antifúngica de los terpenos.⁸⁹



Origen geográfico del propóleos

Figura N° 30 Concentración inhibitoria mínima del extracto etanólico de propóleos de los departamentos (Arequipa, Cusco y Tacna) frente a *Candida albicans*. Los valores representan el promedio $\pm \sigma$. * ($p < 0.05$). ANOVA seguido de la prueba de Tukey.

Fuente: Elaboración propia

6.2. Concentración Bactericida o Fungicida Mínima (CBM o CFM)

6.2.1. *Staphylococcus aureus*

Luego de la determinación de la CIM, se halló la CBM de los extractos etanólicos de propóleos procedentes de los departamentos de Arequipa, Cusco y Tacna; sobre las cepas de *Staphylococcus aureus*. Las CBMs obtenidas fueron 87.5 ± 11.2 , 68.2 ± 6.5 y 95.5 ± 15.1 mg/L; para los extractos de los departamentos de Arequipa, Cusco y Tacna; respectivamente. La **Figura N° 31** muestra estos resultados. Las CIMs son menores a las CBMs, debido a que las CIMs son las concentraciones de los extractos de propóleos que solo inhiben el crecimiento de los microorganismos. Por otro lado, las CBMs son las concentraciones que no solo inhiben el crecimiento de las bacterias, sino también que provocan la muerte bacteriana.

La evaluación de la concentración bactericida mínima del propóleos, ha sido reportada en distintas investigaciones.^{90,91} Sin embargo, la información obtenida en el presente estudio es importante para la región sur de nuestro país, debido a que las características particulares del propóleos depende en gran medida a su lugar de origen.

Mediante un análisis de varianza de una sola vía, se encontró que las CBMs de los extractos de propóleos de los distintos departamentos en estudio, presentaron diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$). Luego, mediante la prueba de Tukey, se halló que las CBMs de los extractos de propóleos que provenían de Arequipa y Tacna fueron estadísticamente similares. Lo que podría indicar que los propóleos de estos departamentos presentan un origen botánico análogo.⁹² Además, se pudo observar que el extracto etanólico del propóleos de Cusco presentó una menor CBM. Asimismo, tomando en cuenta otras investigaciones se ha visto que el origen geográfico del propóleos está relacionado con su composición y por lo tanto con su actividad antimicrobiana.⁹³ Por otro lado, Scazzocchio *et al.*, ha reportado que el extracto etanólico de propóleos presenta un efecto inhibitorio de la lipasa y coagulasa del *Staphylococcus aureus*.⁹⁴

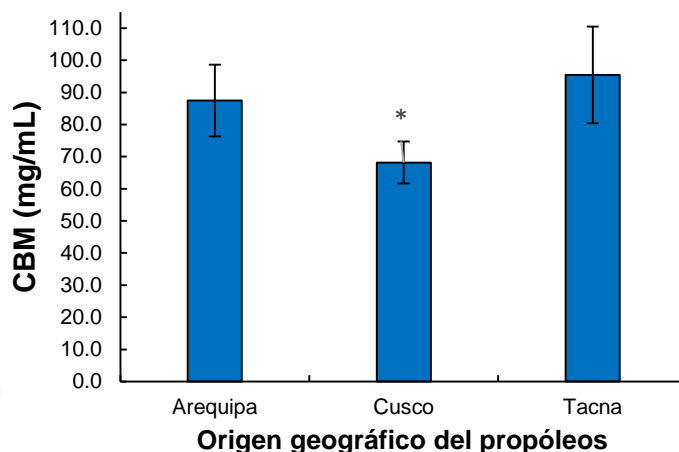


Figura N° 31 Concentración bactericida mínima del extracto etanólico de propóleos de los departamentos (Arequipa, Cusco y Tacna) frente a *Staphylococcus aureus*. Los valores representan el promedio $\pm \sigma$. * ($p < 0.05$). ANOVA seguido de la prueba de Tukey.

Fuente: Elaboración propia

6.2.2. *Candida albicans*

Las concentraciones fungicidas mínimas de los extractos etanólicos de propóleos procedentes de Arequipa, Cusco y Tacna fueron 94.3 ± 8.6 , 89.8 ± 7.5 y 104.5 ± 6.3 mg/mL; respectivamente (**Figura N° 32**). Se ha reportado una investigación que evalúa la CFM de extractos etanólicos propóleos recolectados en distintas regiones de Brasil, dando como resultado que estos extractos presentan una CFM mayor a $500 \mu\text{g/mL}$.⁹⁵ Además, existen distintos estudios que sugieren un posible mecanismo de la actividad antifúngica del propóleos; Freires *et al.*, indican que esta capacidad podría deberse a la presencia de flavonoides en su composición química.⁹⁵ Asimismo, Pippi *et al.*, sugieren que el propóleos podría provocar una disrupción de la pared celular de la *Candida albicans*.⁹⁶

Se efectuó un análisis de varianza de una sola vía, hallándose que existe diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre las CFMs de los extractos de cada departamento. Seguidamente, se realizó la prueba de Tukey

que mostró que la CFM para el extracto de Arequipa y Cusco son estadísticamente similares. Además, se observó que el extracto con el propóleo obtenido de Tacna, presenta una menor actividad fungicida. Esto posiblemente esté relacionado al tipo de flavonoides que tiene este extracto en comparación a los otros. Por otro lado, un estudio ha señalado que el propóleo puede ser usado como un agente antifúngico efectivo similar al hipoclorito de sodio.⁸⁶

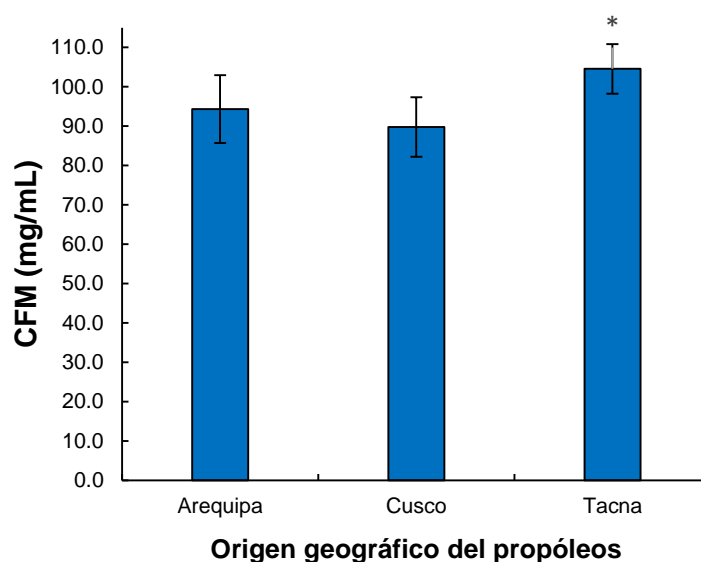


Figura N° 32 Concentración fungicida mínima del extracto etanólico de propóleos de los departamentos (Arequipa, Cusco y Tacna) frente a *Candida albicans*. Los valores representan el promedio $\pm \sigma$. * ($p < 0.05$). ANOVA seguido de la prueba de Tukey.

Fuente: Elaboración propia

6.3. Sensibilidad antimicrobiana

6.3.1. *Staphylococcus aureus*

Se realizó la prueba de sensibilidad antimicrobiana, la cual dio como resultados zonas de inhibición para los extractos de propóleos de Arequipa, Cusco y Tacna en rangos de 13 ± 2 - 28 ± 3 , 15 ± 2 - 31 ± 3 y 12 ± 1 - 26 ± 3 mm, respectivamente frente a *Staphylococcus aureus*. Un ejemplo del método de difusión en disco realizado para la evaluación de los extractos etanólicos frente a *Staphylococcus aureus* se muestra en la **Figura N° 33**. El estudio realizado

por Afrouzan *et al.*, señala que las zonas de inhibición de un extracto etanólico de propóleos contra *Staphylococcus aureus* fueron de 11-13mm.⁹⁷ Lo cual se encuentra dentro de los rangos hallados en la presente investigación.

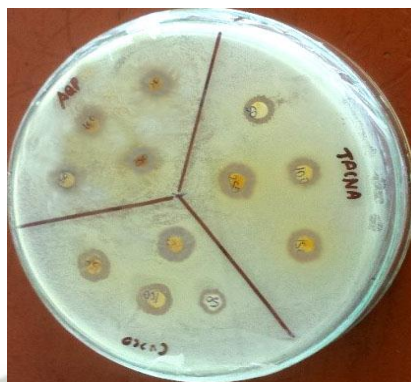


Figura N° 33 Zonas de inhibición para los tres extractos etanólicos a diferentes concentraciones frente a *Staphylococcus aureus*.

Fuente: Elaboración propia

Por medio de un análisis de varianza de dos factores con una sola muestra por grupo, se determinó que existe diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre las zonas de inhibición de los extractos de cada departamento a las diferentes concentraciones estudiadas. Debido a esto, se realizó la prueba de Tukey, la cual señaló que hubo diferencia significativa entre las concentraciones usadas con cada extracto, sin embargo demostró que existe similitud entre la procedencia de los extractos de Arequipa y Tacna frente al *Staphylococcus aureus*, como se muestra en la **Figura N° 34**. Además, se observó que el extracto etanólico de propóleos de Cusco provocó una mayor sensibilidad antimicrobiana contra el *Staphylococcus aureus*. Es probable que la mayor capacidad antimicrobiana del propóleos de Cusco se deba a su composición, especialmente a la mayor cantidad de terpenos que posee, ya que se ha reportado en la literatura que estos están relacionados con el efecto antimicrobiano.⁹⁸

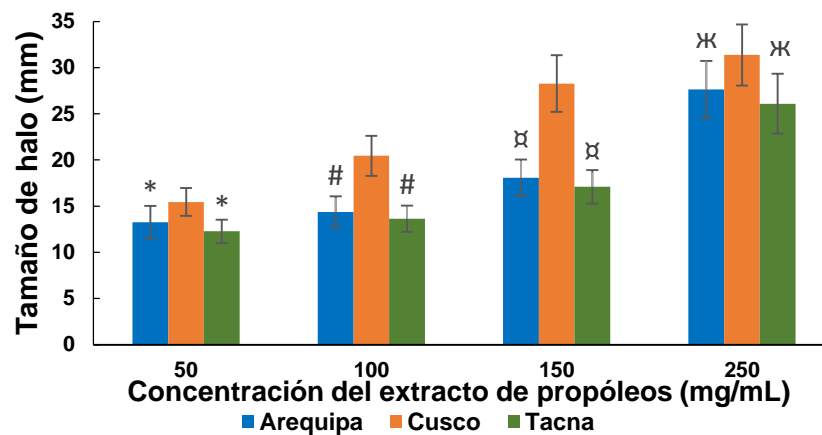


Figura N° 34 Zonas de inhibición del extracto etanólico de propóleos de los departamentos (Arequipa, Cusco y Tacna) a diferentes concentraciones frente a *Staphylococcus aureus*. Los valores representan el promedio $\pm \sigma$. *#αЖ ($p < 0.05$) ANOVA de dos vías seguido de la prueba de Tukey.

Fuente: Elaboración propia

6.3.2. *Candida albicans*

La prueba de sensibilidad antimicrobiana dio como resultados zonas de inhibición para los extractos de propóleos en rangos de 12 ± 1 - 23 ± 2 , 15 ± 1 - 27 ± 2 y 10 ± 1 - 21 ± 3 mm, respectivamente frente a *C. albicans*. La **Figura N° 35** muestra un ejemplo de la realización de este método. El estudio realizado por Pires *et al.*, indicó que al usar un extracto etanólico de propóleos con una concentración de 110 mg/mL se produjo una zona de inhibición de 16 mm.⁹⁹ Asimismo, en la investigación realizada por Kujumgiev *et al.*, se vio que diferentes extractos etanólicos de propóleos han provocado zonas de inhibición en un rango de 14.3-18.2 mm.⁶³ Ambos estudios señalan datos que se encuentran entre los rangos hallados en el presente estudio.

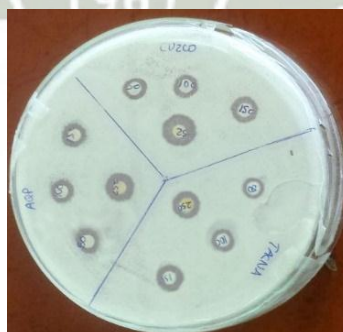


Figura N° 35 Zonas de inhibición para los tres extractos etanólicos a diferentes concentraciones frente a *Candida albicans*.

Fuente: Elaboración propia

Se realizó un análisis de varianza de dos factores con una sola muestra por grupo, encontrándose que existe diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre las zonas de inhibición de los extractos de cada departamento a las diferentes concentraciones estudiadas. Seguidamente, se realizó la prueba de Tukey, que confirmó la diferencia que existió entre la procedencia de los extractos y las concentraciones utilizadas con cada extracto. Esto corroboró que mientras aumentó la concentración del extracto, también aumento el efecto antimicrobiano del mismo (**Figura N° 36**). Se han reportado investigaciones que mostraron. que con el incremento de la concentración del extracto de propóleos hubo un incremento en la zona de inhibición de *Candida albicans*.^{90,97}

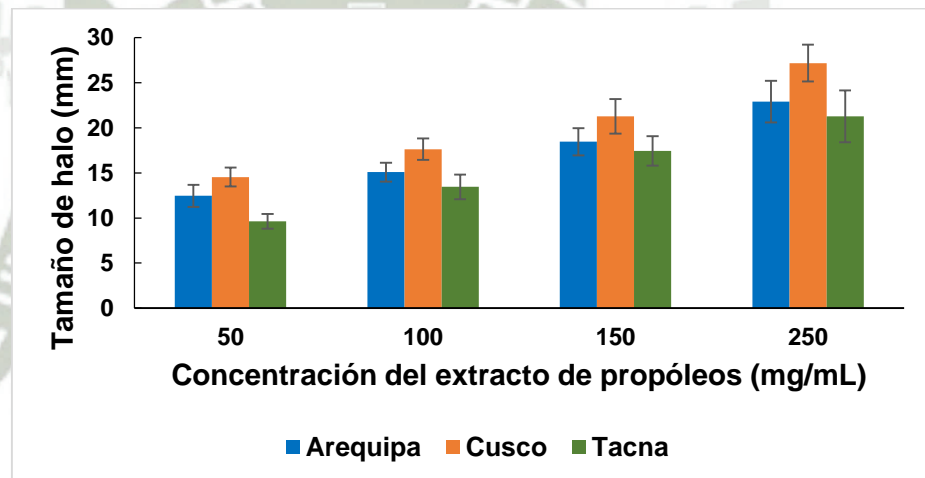


Figura N° 36 Zonas de inhibición del extracto etanólico de propóleos de los departamentos (Arequipa, Cusco y Tacna) a diferentes concentraciones frente a *Candida albicans*. Los valores representan el promedio $\pm \sigma$. ANOVA de dos vías seguido de la prueba de Tukey.

Fuente: Elaboración propia

CONCLUSIONES

1. Se obtuvo los extractos de propóleos mediante percolación con etanol, cloroformo y hexano; de los cuales, el primero tuvo un mayor rendimiento de extracción ($61\% \pm 0.63$, $63\% \pm 0.39$ y $57\% \pm 0.05$; para los propóleos de Arequipa, Cusco y Tacna, respectivamente).
2. El análisis fitoquímico preliminar mediante cromatografía en capa fina, evidenció la presencia de flavonoides, terpenos y taninos en los extractos etanólicos de los propóleos en estudio.
3. Los extractos etanólicos de los propóleos estudiados tienen actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*; además, considerando el estudio preliminar, se evidenció la completa resistencia de *Escherichia Coli* y *Pseudomona aeruginosa*, a los mismos extractos.
4. Las CIMs de los extractos etanólicos de propóleos de Arequipa, Cusco y Tacna, frente a *Staphylococcus aureus*, son 83.0 ± 10.1 ; 64.8 ± 5.1 y 86.4 ± 8.8 mg/mL, respectivamente; mientras que las CBMs son 87.5 ± 11.2 ; 68.2 ± 6.5 y 95.5 ± 15.1 mg/mL, para los extractos de propóleos en el mismo orden; siendo el extracto de propóleos de Cusco el que presenta mayor efecto antimicrobiano ($p < 0.05$).
5. Las CIMs de los extractos etanólicos de propóleos de Arequipa, Cusco y Tacna, frente a *Candida albicans*, son 92.0 ± 8.4 ; 70.5 ± 8.4 y 85.2 ± 7.5 mg/mL, respectivamente; mientras que las CFMs son 94.3 ± 8.6 ; 89.8 ± 7.5 y 104.5 ± 6.3 mg/mL, para los extractos de propóleos en el mismo orden; siendo el extracto de propóleos de Cusco el que presenta mayor efecto antimicrobiano ($p < 0.05$).
6. La sensibilidad antimicrobiana de los extractos etanólicos de propóleos estudiados frente a *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans*, es dependiente de la concentración del extracto ($p < 0.05$) en el rango de 50-250 mg/mL; además, el extracto de propóleos de Cusco presenta un mayor efecto antimicrobiano.

SUGERENCIAS

1. Realizar el estudio del efecto antimicrobiano de propóleos, frente a otros microorganismos.
2. Realizar un análisis de la composición química mediante Cromatografía de Gases acoplada a Espectrómetro de Masas para dilucidar mejor todos los componentes presentes del extracto etanólico de los propóleos.
3. Realizar estudios *in vivo* para evaluar la efectividad y toxicidad que puede presentar el extracto etanólicos de propóleos, así también para determinar la dosis terapéutica para su uso en la población.
4. Investigar otros efectos farmacológicos importantes que pudiera presentar el propóleos.



BIBLIOGRAFÍA

1. Claudio R, Nathanael D R, Mark P S. Resistencia emergente a los antibióticos: una amenaza global y un problema crítico en el cuidado de la salud. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2015;32(1):139–45.
2. Sharapin N. Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos. Convenio Andrés Bello; 2000. (Ciencia y Tecnología).
3. Samara, Benítez C. Actividad antibacteriana y composición cualitativa de propóleos provenientes de dos zonas climáticas del departamento del Cauca. *Biotechnol en el Sect Agropecu*. 2011;9(1):8–16.
4. Sopena R. Nueva enciclopedia Sopena: diccionario ilustrado de la lengua española. Ramón Sopena; 1955. (Nueva enciclopedia Sopena: diccionario ilustrado de la lengua española).
5. Salamanca G. G. Origen naturaleza y características de los propóleos. In: XVI Seminario Americano de Apicultura México. México: Secretaria de Agricultura Pesca y Alimentación; 2002. p. 101–10.
6. Tejada G. Sanidad Apícola. In: II Congreso Nacional de Apicultura. Huancayo-Perú; 2003.
7. Fert G. *Apis mellifera* in the Incas' country.
8. Sisa J. Apicultura Práctica y Medicinal [Internet]. [cited 2016 May 10]. Available from: <http://www.ecoaldea.com/apicultura/propolis.htm>
9. Echazarreta CM, Quezada-Euán JJG, Medina LM, Pasteur KL. Beekeeping in the Yucatan peninsula: development and current status. *Bee World*. 1997;78(3):115–27.
10. Popravko S, Bumba V, Janes A. No Title. In: Congreso Internacional de Apicultura. Alemania; 1991.
11. Blanco-Heras D. medicina natural procedente del panal de abejas: el propóleo, Moleola. *Rev Química la Univ Pablo Olavide*. 2012;(6).
12. Greenaway W, Scaysbrook T, Whatley FR. The composition and plant origins of propolis: a report of work at Oxford. *Bee World*. 1990;71(3):107–18.
13. Marcucci MC. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*. 1995;26(2):83–99.

14. Lotfy M. Biological activity of bee propolis in health and disease. *Asian Pacific J Cancer Prev.* 2006;7(1):22–31.
15. Koo H, Rosalen PL, Cury JA, Park YK, Ikegaki M, Sattler A. Effect of *Apis mellifera* Propolis from Two Brazilian Regions on Caries Development in Desalivated Rats. *Caries Res.* 1999;33(5):393–400.
16. Krell R. Value-added products from beekeeping. *FAO Agriculture Services Bulletin.* 1996. 409 p.
17. Farré R, Frasquet I, Sánchez A. El própolis y la salud. Vol. 45, *Ars Pharmaceutica.* 2004. p. 21–43.
18. Perez Arquillue C, Jimeno Benito F. El propoleos de la abeja. Instituto Nacional de Reforma y Desarrollo Agrario (1987), editor. 1987. 12 p.
19. Silici S, Kutluca S. Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. *J Ethnopharmacol.* 2005;99(1):69–73.
20. Tolosa L, Cañizares E. Obtención, caracterización y evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos de Campeche. *Ars Pharm.* 2002;43.
21. Durk E. The Ability of bee products to modulate human immuno system. In: *Eight International Symposium on trends in Biomedicine in Finland: allergy, oxidants and antioxidants, and human health.* Finlandia; 1997.
22. Bracho J. Calidad de Propóleos de Origen Argentino y propiedades organolépticas. *Dep Química la Fac Ciencias UNALM.*
23. Salamanca G. Origen naturaleza y características de los propóleos. *Memorias XVI Semin Am Apic Secr Agric Pesca y Aliment.* 2002;1001–110.
24. Martinez A. Identificación de flavonoides con actividad antioxidante presentes en *Alchornea coelophylla*. *Universidad Tecnológica de Pereira;* 2014.
25. Samara, Benítez C. Actividad antibacteriana y composición cualitativa de propóleos provenientes de dos zonas climáticas del departamento del Cauca. *Biotechnol en el Sect Agropecu.* 2011;9:8–16.
26. Morales D. Evidencia científica del propóleos del Congreso Internacional de propóleos. *Buenos Aires;* 2000.
27. Tejada G. Sanidad Apícola. *II Congreso Nacional de Apicultura.* Huancayo-Perú; 2003.
28. Kuklinski C. Farmacognosia: estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. *Omega;* 2000.

29. Carrión A, García C. “Preparación De Extractos Vegetales: Determinación De Eficiencia De Metódica. Univ CUENCA. 2010;(Tesis previa a la obtención del título de Bioquímica y Farmecéutica):27–31.
30. Forbes BA, Sahm DF. Bailey & Scott’s Diagnostico microbiológico. 12th ed. Madrid: Panamericana; 2009.
31. Torres Tovar H. Guía de prácticas de Farmacognosia II. 2002.
32. De Ugaz OL. Invetigacion Fitoquimica, Metodos en el estudio de productos naturales. Segunda Edicion. Fondo Editorial de la Pontifiicia Universidad Católica del Perú; 1994.
33. Castro-Chambi G. Efecto in vitro del aceite esencial de satureja boliviana muña sobre Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Pseudomona aeruginosa. UCSM; 2003.
34. Pahissa A. Infecciones producidas por Staphylococcus aureus. 1st ed. Barcelona: Marge medica books; 2009.
35. Forbes B. Micologia. In: Diagnóstico microbiológico. 12th Ed. Madrid: Panamericana; 2009. p. 683–721.
36. Romero D. Microbiologia y Parasitologia Humana. 3rd ed. Panamericana M, editor. 2007.
37. Toreti VC, Sato HH, Pastore GM, Park YK. Recent progress of propolis for its biological and chemical compositions and its botanical origin. Evidence-based Complement Altern Med. 2013;2013.
38. Pumarola A, Rodriguez-Torres A, Garcia-Rodriguez J., Piedrola-Angulo G. Microbiologia y parasitología medica. 2nd ed. Barcelona S, editor. Madrid; 2005.
39. Kostova I, Ojala T, Lacy A, O’Kennedy R, Widelski J, Melliou E, et al. Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants. J Nat Prod. 2010;5(8):440.
40. Jones WP, Kinghorn AD. Extraction of Plant Secondary Metabolites. In: Natural Product Isolation. 2012. p. 341–66.
41. Wagner H, Bladt S. Introduction. In: Plant Drug Analysis. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1996. p. 1–2.
42. Touchstone JC. Thin Layer Chromatography. In: Handbook of Analytical Techniques. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH; 2008. p. 327–44.

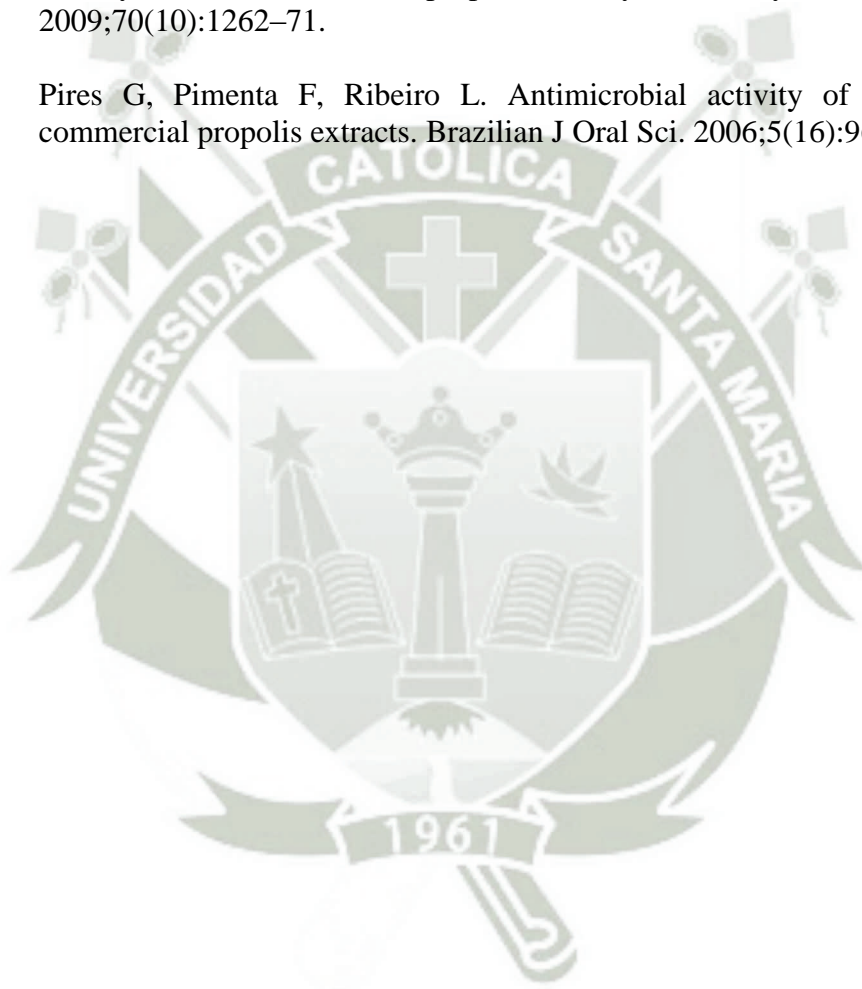
43. Rouessac F, Rouessac A. Chemical Analysis: Modern Instrumentation Methods and Techniques. 2nd ed. John Wiley & Sons; 2007. 1-574 p.
44. Tiwari R, Hoondal G, Tewari R. Microbial physiology: growth and metabolism. In: Laboratory techniques in microbiology and biotechnology. Chandigarh: Global Media; 2008. p. 51–84.
45. Aneja K. Preparation of culture media. In: Experiments in microbiology, plant pathology and biotechnology. 4th Ed. New Delhi: New Age International; 2003. p. 147–56.
46. Roberts D, Greenwood M. Confirmatory biochemical tests. In: Practical Food Microbiology. 3rd Ed. UK: Blackwell; 2003. p. 243–58.
47. Beveridge T. Use of the Gram stain in microbiology. Biotech Histochem. 2001 Jan;76(3):111–8.
48. Brown L, Wolf JM, Prados-Rosales R, Casadevall A. Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. Nat Rev Microbiol. Nature Publishing Group; 2015;13(10):620–30.
49. Byadarahally Raju S, Rajappa S. Isolation and Identification of Candida from the Oral Cavity. ISRN Dent. 2011;1:1–7.
50. Zhou X, Li Y. Oral Mucosal Microbes. In: Atlas of Oral Microbiology. London: Elsevier; 2015. p. 95–107.
51. Ewing W. Edwards and Ewing's identification of Enterobacteriaceae. 4th Ed. New York: Elsevier; 1986. 1-536 p.
52. Andrews JM. Determination of minimum inhibitory concentrations. J Antimicrob Chemother. 2001 Jul;48(1):5–16.
53. Balouiri M, Sadiki M, Ibsouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. J Pharm Anal. Elsevier; 2016;6(2):71–9.
54. Li Y, Fabiano A, Chemat F. Essential Oils as Reagents in Green Chemistry. 1st Ed. Cham: Springer; 2014. 1-71 p. (SpringerBriefs in Molecular Science).
55. Barry AL, Coyle MB, Thornsberry C, Gerlach EH, Hawkinson RW. Methods of measuring zones of inhibition with the Bauer-Kirby disk susceptibility test. J Clin Microbiol. 1979;10(6):885–9.
56. Jave M. Practicas de microbiología I. Primera Ed. Arequipa: Universidad Católica de Santa María; 2013. 1-85 p.

57. Castro G. Efecto in vitro del aceite esencial de satureja boliviana muña sobre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*. Arequipa: Universidad Católica de Santa María; 2003. 1-96 p.
58. Damiani N, Fernández NJ, Maldonado LM, Álvarez AR, Eguaras MJ, Marcangeli JA. Bioactivity of propolis from different geographical origins on *Varroa destructor* (Acari: Varroidae). *Parasitol Res.* 2010;107(1):31–7.
59. Chaillou LL, Herrera HA, Maidana JF. Estudio del propóleos de Santiago del Estero, Argentina. *Ciência e Tecnol Aliment Campinas.* 2004;24(1):11–5.
60. Palomino, Lady, Martínez J, García C, Gil J, Durango D. Physicochemical Characterization and Antimicrobial Activity of Propolis from Municipality of La Union (Antioquia , Colombia). *Rev Fac Nac Agron.* 2010;63(1):5373–83.
61. Lozina LA, Peichoto ME, Acosta OC, Granero GE. Estandarización y caracterización organoléptica y físico-química de 15 Propóleos Argentinos. *Lat Am J Pharm.* 2010;29(1):102–10.
62. Grange JM, Davey RW. Antibacterial properties of propolis (bee glue). *J R Soc Med.* 1990;83(3):159–60.
63. Kujumgiev A, Tsvetkova I, Serkedjieva Y, Bankova V, Christov R, Popov S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J Ethnopharmacol.* 1999;64(3):235–40.
64. Popova M, Silici S, Kaftanoglu O, Bankova V. Antibacterial activity of Turkish propolis and its qualitative and quantitative chemical composition. *Phytomedicine.* 2005;12(3):221–8.
65. Killacky J, Ross MSF, Turner TD. THE DETERMINATION OF ,B-GLYCYRRHETINIC ACID IN LIQUORICE BY HIGH PRESSURE LIQUID CHROMATOGRAPHY. *Planta Med.* 1976;30:310–6.
66. Wagner H, Bladt S. Flavonoid Drugs Including Ginkgo Biloba and Echinaceae Species. In: *Plant Drug Analysis.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1996. p. 195–245.
67. Mabry TJ, Markham KR, Thomas MB. *The Systematic Identification of Flavonoids.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1970.
68. Garcia S, Heinzen H, Martinez R, Moyna P. Identification of flavonoids by TLC scanning analysis. *Chromatographia.* 1993;35(7–8):430–4.
69. Chang C-C, Yang M-H, Wen H-M, Chern J-C. Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. *J Food Drug Anal.* 2002;10(3):178–82.

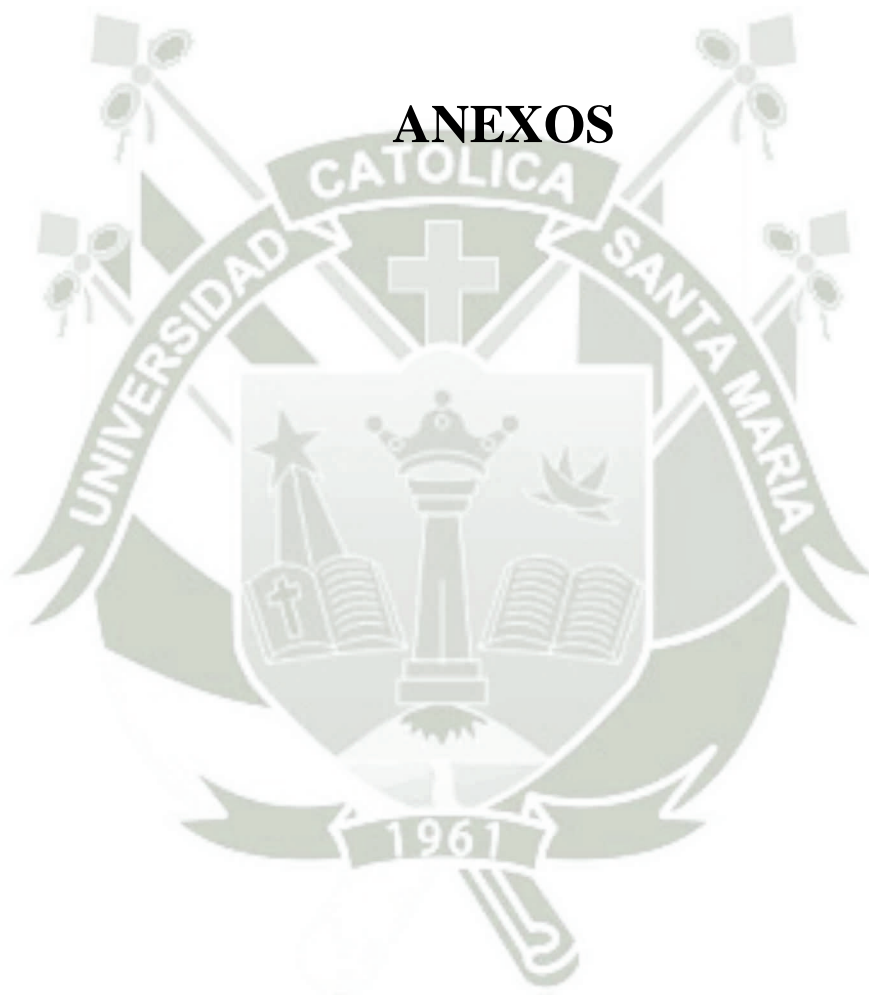
70. Hashimoto F, Nonaka G, Nishioka I. Tannins and Related Compounds. LVI Isolation of Four New Acylated Flavan-3-ols from Oolong Tea. *Chem Pharm Bull.* 1987;35(2):611–6.
71. Kalia P, Kumar NR, Harjai K. Phytochemical Screening and Antibacterial Activity of different extracts of propolis. *Int J Pharm Biol Res.* 2013;1(6):219–22.
72. Wagner H, Bladt S. Alkaloid Drugs. In: *Plant Drug Analysis.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1996. p. 3–51.
73. Wagner H, Bladt S. Drugs Containing Sweet-Tasting Terpene Glycosides. In: *Plant Drug Analysis.* Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1996. p. 329–33.
74. Bankova VS, de Castro SL, Marcucci MC. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie.* 2000 Jan;31(1):3–15.
75. Trusheva B, Popova M, Bankova V, Simova S, Marcucci MC, Miorin PL, et al. Bioactive constituents of Brazilian red propolis. *Evidence-based Complement Altern Med.* 2006;3(2):249–54.
76. Bankova VS, Christov RS, Tejera AD. Lignans and other constituents of propolis from the canary islands. *Phytochemistry.* 1998;49(5):1411–5.
77. Muruhan S, Rajan M, Konuku S. Morphological and biochemical characteristics and antibiotic resistance pattern of *Staphylococcus aureus* isolated from grapes. *Int J Nutr Pharmacol Neurol Dis.* 2012;2(1):70–3.
78. Woodford N, Livermore DM. Infections caused by Gram-positive bacteria: a review of the global challenge. *J Infect. The British Infection Society;* 2009;59(SUPPL. 1):S4–16.
79. Estridge B, Reynolds A. Basic Clinical Microbiology. In: *Basic Clinical Laboratory Techniques.* 6th Ed. Ney York: Delmar; 2011. p. 689–814.
80. Parija SC. Bacteriology. In: *Textbook of microbiology & immunology.* India: Elsevier; 2009. p. 180–90.
81. Mohan S. Fungi. In: *Gram Stain: Looking Beyond Bacteria to Find Fungi in Gram Stained Smear.* Canada: AuthorHouse; 2009. p. 6–20.
82. Lepekhin V, Leonova T. Some data concerning the study of antimicrobial properties of propolis. *Stomatol.* 1970;49:16–9.
83. Denyer SP, Maillard J-Y. Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-negative bacteria. *J Appl Microbiol.* 2002 May;92:35S–45S.

84. Trombetta D, Castelli F, Sarpietro MG, Venuti V, Cristani M, Daniele C, et al. Mechanisms of Antibacterial Action of Three Monoterpenes. *J Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(6):2474–8.
85. Pavilonis A, Baranauskas A, Puidokaite L, Mazeliene Z, Savickas A, Radziūnas R. Antimicrobial activity of soft and purified propolis extracts. *Med.* 2008;44(12):977–83.
86. Garg P, Singh U, Mishra C, Nagpal R, Tyagi S, Sinha D. Comparison of antimicrobial efficacy of propolis, *Morinda citrifolia*, *Azadirachta indica* (Neem) and 5% sodium hypochlorite on *Candida albicans* biofilm formed on tooth substrate: An in-vitro study. *J Conserv Dent.* 2013;16(6):532–5.
87. León G, Sacsquispe S, Zurita S. Efecto antifúngico in vitro sobre el crecimiento en *Candida albicans* ATTC 90028, *Candida glabrata* ATCC 90030 y *Candida krusei* ATCC 6258 expuestas al propóleo de Oxapampa a las 24, 48 y 120 horas. *Rev Investig la Univ Norbert Wiener.* 2014;3:23–9.
88. Takaisi-Kikuni N, Schilcher H. Electron Microscopic and Microcalorimetric Investigations of the Possible Mechanism of the Antibacterial Action of a Defined Propolis Provenance. *Planta Med.* 1994 Jun;60(3):222–7.
89. Dalleau S, Cateau E, Bergès T, Berjeaud JM, Imbert C. In vitro activity of terpenes against *Candida* biofilms. *Int J Antimicrob Agents.* 2008;31(6):572–6.
90. Waldner-Tomic N, Vanni R, Belibasakis G, Thurnheer T, Attin T, Schmidlin P. The in Vitro Antimicrobial Efficacy of Propolis against Four Oral Pathogens: A Review. *Dent J.* 2014 Jul;2(3):85–97.
91. Motior M, Richardson A, Sofian-Azirun M. Antibacterial activity of propolis and honey against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *African J Microbiol Res.* 2010;4(16):1872–8.
92. Ghisalberti E. Propolis: a review. *Bee World.* 1979;60(2):59–84.
93. Cardoso R, Maboni F, Machado G, Alves SH, de Vargas A. Antimicrobial activity of propolis extract against *Staphylococcus coagulase positive* and *Malassezia pachydermatis* of canine otitis. *Vet Microbiol.* 2010;142(3–4):432–4.
94. Scazzocchio F, D’Auria FD, Alessandrini D, Pantanella F. Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. *Microbiol Res.* 2006;161(4):327–33.
95. Freires IA, Queiroz VCPP, Furletti VF, Ikegaki M, de Alencar SM, Duarte MCT, et al. Chemical composition and antifungal potential of Brazilian propolis against *Candida* spp. *J Mycol Med.* 2016;26(2):122–32.

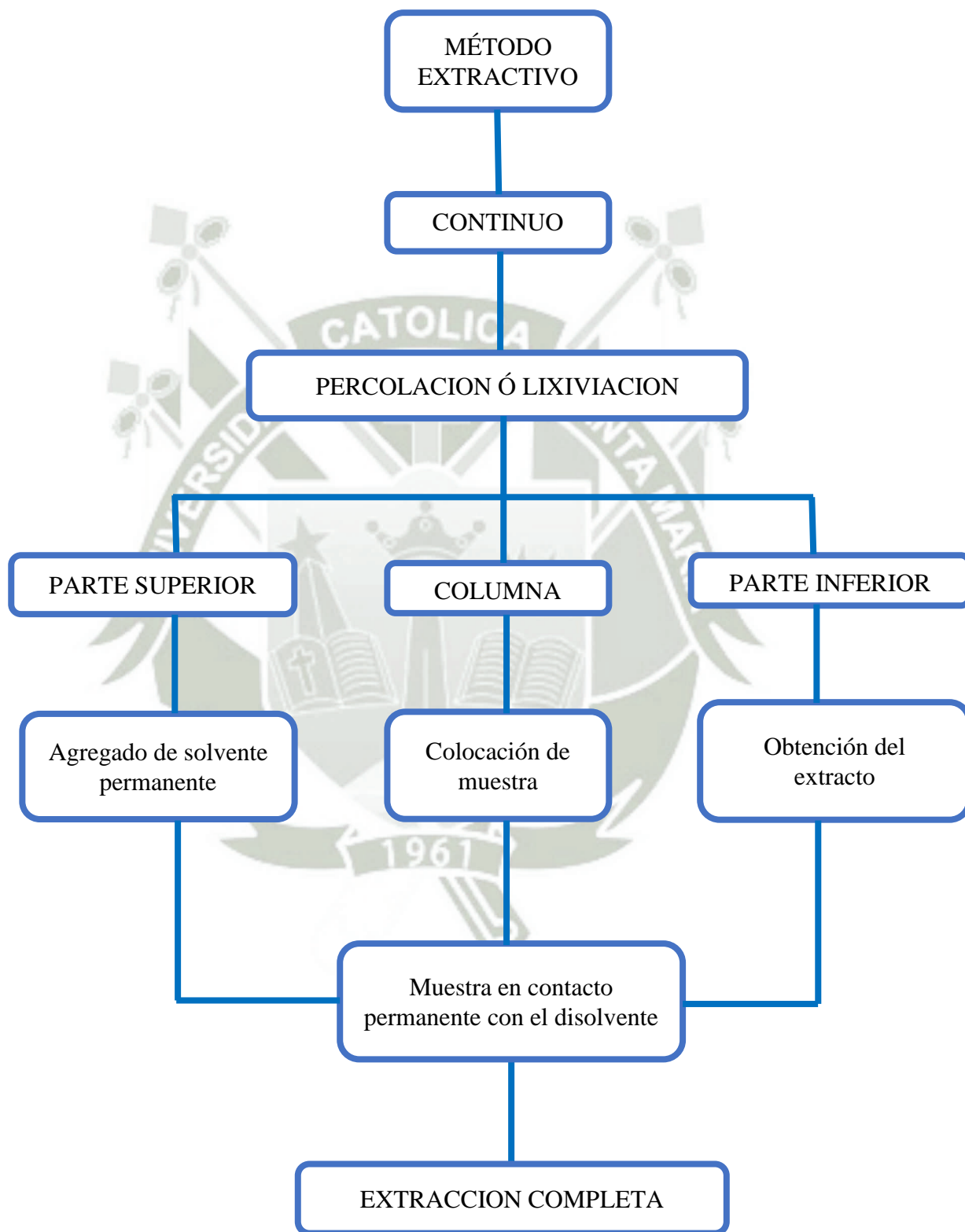
96. Pippi B, Lana A, Moraes R, Gez C, Machado M, de Oliveira L, et al. In vitro evaluation of the acquisition of resistance, antifungal activity and synergism of Brazilian red propolis with antifungal drugs on *Candida* spp. *J Appl Microbiol.* 2015;118(4):839–50.
97. Afrouzan H, Amirinia C, Mirhadi S, Ebadollahi A, Vaseji N, Tahmasbi G. Evaluation of antimicrobial activity of propolis and nanopropolis against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. *African J Microbiol Res.* 2012;6(2):421–5.
98. Popova MP, Chinou IB, Marekov IN, Bankova VS. Terpenes with antimicrobial activity from Cretan propolis. *Phytochemistry. Elsevier Ltd;* 2009;70(10):1262–71.
99. Pires G, Pimenta F, Ribeiro L. Antimicrobial activity of two brazilian commercial propolis extracts. *Brazilian J Oral Sci.* 2006;5(16):967–70.



ANEXOS



Anexo 1
ANEXO N°1
ESQUEMA DE PROCEDIMIENTO DE EXTRACCION DEL PROPOLEOS



ANEXO N°2 OBTENCIÓN DEL LOS EXTRACTOS



1. Muestras de porpoleos en el siguiente orden (Tacna, Arequipa y Cusco)



2. Metodo de Extraccion: Percolacion



3. Extractos etanolicos (Tacna, Cusco y Arequipa)



4. Extractos cloroformicos (Arequipa, Cusco y Tacna)



5. Extractos Hexanicos (Arequipa Cusco y Tacna)



ANEXO N°3
**MUESTRAS ATCC Y PATÓLOGICAS DE CEPAS *Escherichia coli*,
Pseudomona aeruginosa, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans***



Cepas ATCC



Cepas patológicas de
Staphylococcus aureus



Cepas patológicas de
Escherichia coli

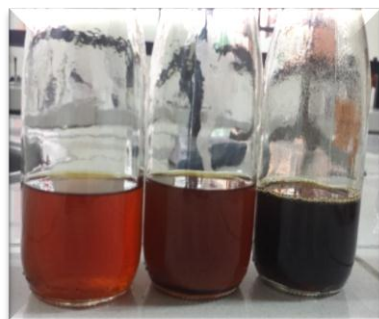


Cepas patológicas de
Pseudomona aeruginosa



Cepas patológicas de
Candida albicans

ANEXO N°4 DETERMINACIÓN DE PORCENTAJE DE RENDIMIENTO



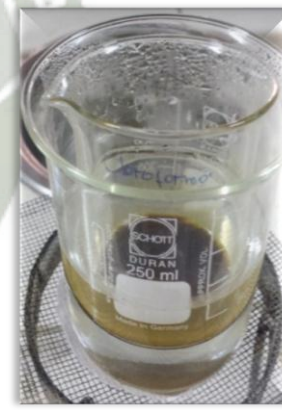
Extractos etanólicos
(Tacna, Arequipa y Cusco)



Extractos clorofórmicos
(Tacna, Arequipa y Cusco)



Extractos hexánicos
(Tacna, Arequipa y Cusco)

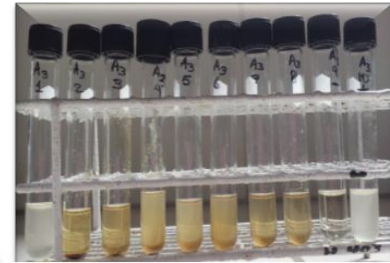


Evaporación del solvente (etanol,
cloroformo y hexano) a baño maría.

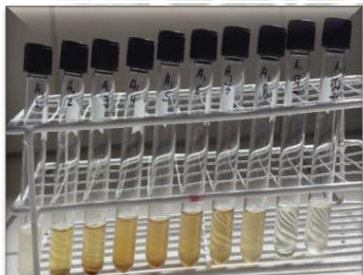
ANEXO N°5
CIM (CONCENTRACION MÍNIMA INHIBITORIA)



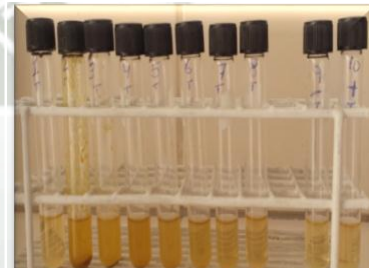
EEP Arequipa, Cusco y Tacna



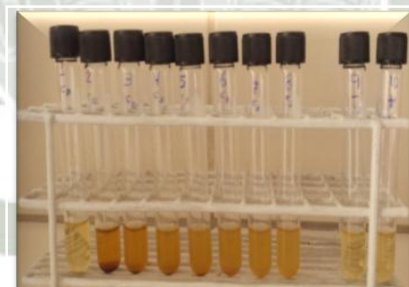
CIM Arequipa para *S. aureus*



CIM Cusco para *S. aureus*



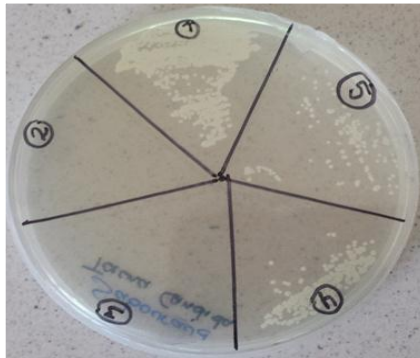
CIM Tacna para *C. albicans*



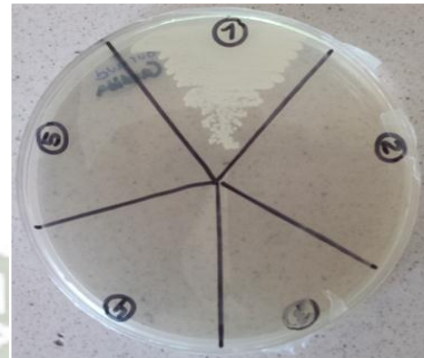
CIM Arequipa para *C. albicans*

ANEXO N°6
CBM Y CFM (CONCENTRACIÓN BACTERICIDA Y FUNGICIDA MÍNIMA)

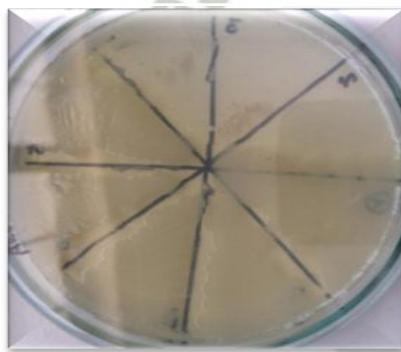
CFM Arequipa de *C. albicans*



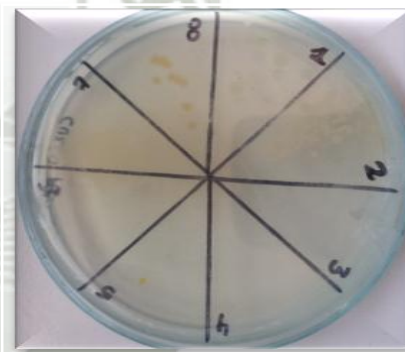
CFM Cusco de *C. albicans*



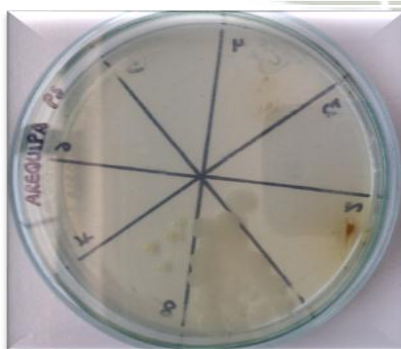
CFM Tacna de *C. albicans*



CBM Arequipa de *S. aureus*



CBM Cusco de *S. aureus*



CBM Tacna de *S. aureus*



ANEXO N°7
HALOS DE INHIBICIÓN A DIFERENTES CONCENTRACIONES.



Halos de inhibición Arequipa para *C. albicans*



Halos de inhibición Cusco para *C. albicans*



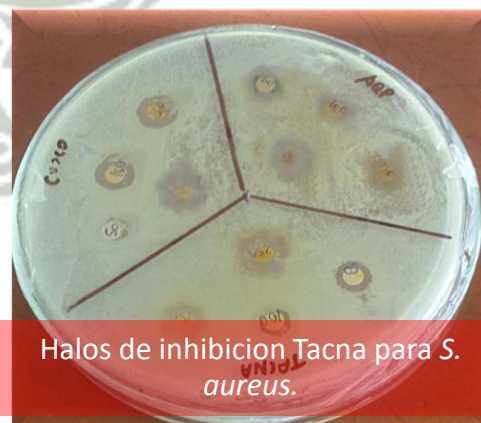
Halos de inhibición Tacna para *C. albicans*



Halos de inhibición Arequipa para *S. aureus*.



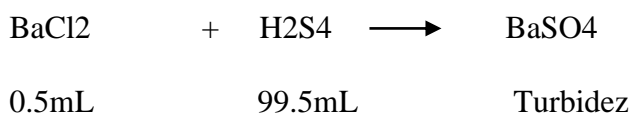
Halos de inhibición Cusco para *S. aureus*.



Halos de inhibición Tacna para *S. aureus*.

ANEXO N°8
ESCALA DE Mc. FARLAND

COMPOSICIÓN



PREPARACIÓN

Para preparar el estándar se agrega 0.5mL de BaCl₂ 0.048M a 99.5mL de H₂SO₄ 0.36N.

CÁLCULOS

1. Para preparar 100mL de Cloruro de Bario 0.048M

$$\frac{0.048\text{mol}}{1000\text{mL}} \cdot \frac{(100\text{mL}) \cdot 208.3\text{g BaCl}_2}{1\text{mol}} = 0.99984\text{g Cl}_2\text{Ba en } 100\text{mL}$$

2. Para preparar 1000mL de Acido sulfurico 0.36N

$$\frac{0.36\text{Equ}}{1000\text{mL}} \cdot \frac{(1000\text{mL}) \cdot 98.08\text{g}/2}{1\text{Equ}} = 9.59478 \text{ mL de H}_2\text{SO}_4$$

al96%

$$1000\text{mL} \quad 1\text{Equ} \quad 1.84\text{g}$$

Para llevarlo al 100%

$$9.59478 \text{ ----- } 96\%$$

$$X \text{ ----- } 100\%$$

X= 9.99mL de H₂SO₄ en 1000mL.

ANEXO N°9 AGAR MUELLER HINTON

Este medio de cultivo ha sido recomendado para la prueba de sensibilidad a los antimicrobianos. Además es útil con el agregado de sangre para el cultivo y aislamiento de microorganismos.

FUNDAMENTO

En el medio de cultivo la mayoría de los patógenos crecen satisfactoriamente, presenta buena reproducibilidad en las pruebas de sensibilidad, cuando se suplementa con sangre de carnero a 5% es útil para realizar la prueba de sensibilidad a los antimicrobianos en especies de estreptococos.

COMPOSICION

FORMULA (EN GRAMOS POR LITRO)	
Infusión de carne	300.0 g
Peptona acida de caseína	17.5 g
Almidón	1.5 g
Agar – agar	15.0 g
Agua destilada	1000.0 mL
pH final: 7.3 ± 0.1	

PREPARACION

Suspender 37 g del medio deshidratado en un litro de agua destilada, dejar embeber 10 a 15 minutos, calentar con agitación y dejar hervir de 1 a 2 minutos. Esterilizar, llevar a la autoclave a 121 ° C por 15 minutos.

CARACTERISTICA DEL MEDIO

Medio de preparación: color ámbar.

ANEXO N°10 AGAR SABOURAUD

Este medio de cultivo es utilizado para cultivo de mohos y levaduras patógenas y no patógenas.

FUNDAMENTO

Medio de cultivo recomendado para el aislamiento y desarrollo de hongos. La peptona, la tripteina y glucosa son los nutrientes para el desarrollo de microorganismos. El alto contenido de glucosa, la presencia de cloranfenicol y pH ácido inhiben el desarrollo bacteriano y favorecen así el crecimiento de hongos.

COMPOSICION

FORMULA (EN GRAMOS POR LITRO)	
Peptona	10.0 g
Tripteina	5.0 g
Glucosa	40.0 g
Cloranfenicol	50.0 mg
Agar – agar	15.0 g
Agua destilada	1000.0 mL
pH final: 5.6 ± 0.2	

PREPARACION

Suspender 65 g del polvo en un litro de agua destilada, mezclar hasta uniformar, calentar agitando frecuentemente y hervir de 1 a 2 minutos hasta disolver completamente. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

CARACTERISTICA DEL MEDIO

Medio de preparacion: ambar claro, ligeramente opalescente sin ningun precipitado.

ANEXO N°11 AGAR BAIRD – PARKER

Medio moderadamente selectivo y de diferenciación para el aislamiento y recuento de *Staphylococcus aureus* en alimentos, muestras ambientales y clínicas.

FUNDAMENTO

Contiene las fuentes de carbono y nitrógeno necesarias para el crecimiento. La glicina, cloruro de Litio y el telurito potásico actúan como agentes selectivos. La yema de huevo constituye el sustrato para determinar la producción de lecitina y además la actividad de lipasa. Los estafilococos producen colonias de color gris oscuro a negro debido a la reducción del telurito, los estafilococos que producen lecitinasa descomponen la yema de huevo y crean zonas transparentes alrededor de las colonias correspondientes.

Se debe confirmar la presencia *S. aureus* mediante pruebas bioquímicas

COMPOSICION

FORMULA (EN GRAMOS POR 940 ML)	
Peptona de caseína	10.0 g
Extracto de carne	5.0 g
Extracto de levadura	1.0 g
Cloruro de litio	5.0 g
Agar – agar	20.0 g
Glicina	12.0 g
Piruvato de sodio	10.0 g
Agua destilada	940.0 mL
pH final: 6.8 ± 0.2	

PREPARACION

Suspender 60 g del medio deshidratado en 940 mL de agua destilada, calentar agitando frecuentemente y dejar hervir de 1 a 2 minutos hasta disolver completamente. Llevar al autoclave por 15 minutos a 121°C.

CARACTERISTICA DEL MEDIO

Medio de preparacion: ambar claro opalescente (sin agregado de yema de huevo). Las colonias típicas del *Staphylococcus aureus* son pequeñas, negras, rodeadas de una zona clara.

ANEXO N°12 AGAR CETRIMIDE

Medio utilizado para el aislamiento selectivo de *Pseudomonas aeruginosa* y de otras especies del género.

FUNDAMENTO

La fórmula de este medio está desarrollada para favorecer la selección de *Pseudomona aeruginosa* y estimular la formación de pigmentos, este medio es muy semejante al King A, en el cual la peptona de gelatina aporta nutrientes para el desarrollo microbiano. El cloruro de magnesio y el sulfato de potasio promueven la formación de piocianina, pioverdina, piomelanina y fluoresceína de *Pseudomona aeruginosa*. La cetrimida es un detergente catiónico que actúa como agente inhibidor, libera el nitrógeno y el fósforo de las células de casi toda la flora acompañante, aunque inhibe también algunas especies de *Pseudomonas*. El agar es el agente solidificante.

COMPOSICION

FORMULA (EN GRAMOS POR LITRO)	
Peptona de gelatina	20.0 g
Cloruro de magnesio	1.4 g
Sulfato de potasio	10.0 g
Agar – agar	13.6 g
Cetrimida	0.3 g
Glicerina	10.0 mL
Agua destilada	1000.0 mL
pH final: 7.1 ± 0.2	

PREPARACION

Suspender 45.3 g del polvo por litro de agua destilada. Agregar 10 mL de glicerina, dejar reposar 5 minutos. Calentar agitando frecuentemente y hervir 1 minuto. Esterilizar en autoclave por 15 minutos a 121 ° C.

CARACTERISTICA DEL MEDIO

Medio de preparación: ámbar claro, opalescente con precipitado.

ANEXO N°13 AGAR MAC CONKEY

Medio utilizado para el aislamiento de Bacilos Gramnegativos, aerobios y anaerobios facultativos, debido a la incorporación de sales biliares y cristal violeta. Permite diferenciar bacterias que utilizan o no lactosa.

FUNDAMENTO

En el medio de cultivo, las peptonas aportan los nutrientes necesarios para el desarrollo bacteriano, la lactosa es el hidrato de carbono fermentable, la mezcla de las sales biliares y el cristal violeta son los agentes selectivos que inhiben el desarrollo de gran parte de la flora Grampositiva. Por fermentación de la lactosa, disminuye el pH alrededor de la colonia

Esto produce un viraje del color del indicador de pH (rojo neutro), la absorción en las colonias, y la precipitación de las sales biliares.

Los microorganismos no fermentadores de lactosa producen colonias incoloras.

COMPOSICION

FORMULA (EN GRAMOS POR LITRO)		
Peptona de caseína	17.0	g
Rojo neutro	30.0	mg
Peptona de carne	3.0	g
Cristal violeta	1.0	mg
Lactosa	10.0	g
Sales biliares	1.5	g
Cloruro de sodio	5.0	g
Agar – agar	12.5	g
Agua destilada	1000.0	mL
pH final: 7.1 ± 0.2		

PREPARACION

Suspender 50 g del polvo por litro de agua destilada. Reposar 5 minutos, mezclar hasta uniformar. Calentar suavemente y hervir 1 a 2 minutos hasta disolver por completo. Esterilizar en autoclave a 121° C durante 15 minutos.

CARACTERISTICA DEL MEDIO

Medio de preparacion: rojo purpura.

ANEXO N°14 CALDO BHI (INFUSION CEREBRO CORAZON)

Medio líquido utilizado para cultivar microorganismos patógenos y no patógenos incluyendo bacterias aerobias y anaerobias, además también usado en la preparación de inóculos en pruebas de susceptibilidad microbiana.

FUNDAMENTO

Es un medio usado para el cultivo de microorganismos poco exigentes en sus requerimientos nutricionales. No contiene inhibidores del desarrollo bacteriano.

La peptona es la fuente de carbono y nitrógeno para el desarrollo bacteriano.

El agregado de cloruro de sodio permite el enriquecimiento con sangre de carnero u otras sustancias para facilitar el cultivo de microorganismos exigentes.

COMPOSICION

FORMULA (EN GRAMOS POR LITRO)	
Peptona	17.0 g
Extracto de carne	3.0 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Agar-agar	12.5 g
Agua destilada	1000.0 mL
pH final: 7.3 ± 0.2	

PREPARACION

Suspender 31 gr de polvo por litro de agua destilada, mezclar y dejar reposar. Calentar suavemente agitando, hervirlo de 1 a 2 minutos hasta su disolución. Esterilizar en autoclave a 121°C por 15 min.


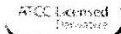

CARACTERISTICA DEL MEDIO

Medio de preparación: Ámbar claro a medio ligeramente opalescente.

ANEXO N°15
CERTIFICADO DE ANÁLISIS: *Staphylococcus aureus* ATCC® 6538™




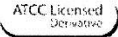

Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

Specifications Microorganism Name: <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i> Catalog Number: 0485 Lot Number: 485-264 Reference Number: ATCC® 6538™ Purity: < 0.1% Total Pellet CFU Recovery: > 1000 CFUs per Pellet Passage from Reference: 2		Expiration Date: 2017/1/31 Release Information: Quality Control Technologist: Tracy A Blenker Release Date: 2015/2/9	
Performance			
Macroscopic Features: Medium to large, convex, circular, glistening, smooth, creamy, opaque, beta hemolytic - both light gold and darker gold colonies may be present.		Medium: SBAP	
Microscopic Features: Gram positive cocci occurring singly, in pairs and in irregular clusters.		Method: Gram Stain (1)	
ID System: Vitek GP (1) See attached iD System results document.		Other Features/ Challenges: Results (1) Catalase (3% Hydrogen Peroxide): positive (1) Coagulase (rabbit plasma-tube): positive (1) Beta Lactamase (Cefinase Disk): negative	
 Brad Goskowicz, President AUTHORIZED SIGNATURE			
Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the packing slip is merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number. Note for Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods. 2. Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information. Individual products are traceable to a recognized culture collection.			
		(*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC. Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.	
 TESTING CERT #2655.01		(*) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.	

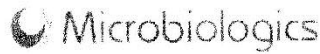
ANEXO N°16
CERTIFICADO DE ANÁLISIS: *Escherichia coli* ATCC® 8739™



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance: Upon Release

Specifications Microorganism Name: Escherichia coli Catalog Number: 0483 Lot Number: 483-508 Reference Number: ATCC® 8739™* Purity: < 0.1% Total Pellet CFU Recovery: > 1000 CFUs per Pellet Passage from Reference: 2		Expiration Date: 2017/3/31 Release Information: Quality Control Technologist: Tracy A Blenker Release Date: 2015/4/13	
Performance			
Macroscopic Features: Medium to large, gray, mucoid, convex. Microscopic Features: Gram negative straight rod.		Medium: SBAP Method: Gram Stain (1)	
ID System: Vitek GN (1) See attached ID System results document.		Other Features/ Challenges: Results (1) Oxidase (Kovacs): negative Beta-glucuronidase (E. coli Broth w/MUG): positive  Brad Goskowicz, President AUTHORIZED SIGNATURE	
<p><small>Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the packing slip is merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.</small></p> <p><small>Note for Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.</small></p> <p><small>1. Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.</small></p> <p><small>Individual products are traceable to a recognized culture collection.</small></p> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="text-align: center;">  </div> <div> <p><small>(*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC. Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.</small></p> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="text-align: center;">  <p><small>TESTING CERT #2655.01</small></p> </div> <div> <p><small>(1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.</small></p> </div> </div>			

CERTIFICADO DE ANÁLISIS: *Pseudomona aeruginosa* ATCC® 9027™



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism Specification and Performance Upon Release

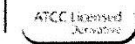
Specifications Microorganism Name: Pseudomonas aeruginosa Catalog Number: 0484 Lot Number: 484-558 Reference Number: ATCC® 9027™* Purity: < 0.1% Total Pellet CFU Recovery: > 1000 CFUs per Pellet Passage from Reference: 2	Expiration Date: 2016/10/31 Release Information: Quality Control Technologist: Tracy A Blerker Release Date: 2014/11/12
---	--

Disclaimer: The last digit(s) of the lot number appearing on the packing slip is merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.

Note for Vittek®: Although the Vittek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.

Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.

Individual products are traceable to a recognized culture collection.




(*) The ATCC Licensed Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC catalog marks are trademarks of ATCC. Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® cultures.




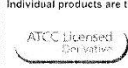

(†) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005.

TESTING CERT #2655.01

ANEXO N°18
CERTIFICADO DE ANÁLISIS: *Candida albicans* ATCC® 10231™



Certificate of Analysis: Lyophilized Microorganism, Specification and Performance Upon Release

Specifications Microorganism Name: <i>Candida albicans</i> Catalog Number: 0443 Lot Number: 443-462 Reference Number: ATCC® 10231™ Purity: < 0.1% Total Pellet CFU Recovery: > 1000 CFUs per Pellet Passage from Reference: 2	Expiration Date: 2017/2/28 Release Information: Quality Control Technologist: Kleshia I. Negen Release Date: 2015/3/25
Performance	
Macroscopic Features: Small to medium, white, circular, convex, dull colonies. Microscopic Features: Gram positive, ovoidal, budding yeast cells	Medium: Nutrient Method: Gram Stain (1)
ID System: Vitek YST (1) See attached ID System results document.	Other Features/ Challenges: Results (1) Germ Tube Test: positive (1) Chlamydospore production: positive <div style="text-align: right;">  Brad Goskovic, President AUTHORIZED SIGNATURE </div>
<p><small>Discard: The last digit(s) of the lot number appearing on the packing slip is merely a packaging event number. The lot number displayed on this certificate is the actual base lot number.</small></p> <p><small>Note for Vitek®: Although the Vitek® panel uses many conventional tests, the unique environment of the card, combined with the short incubation period, may produce results that differ from published results obtained by other methods.</small></p> <p><small>Refer to the enclosed product insert for instructions, intended use and hazard/safety information.</small></p> <p><small>Individual products are traceable to a recognized culture collection.</small></p> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="text-align: center;">  </div> <div style="font-size: small;"> (1) The ATCC Licensee Derivative Emblem, the ATCC Licensed Derivative word mark and the ATCC safety marks are trademarks of ATCC Microbiologics, Inc. is licensed to use these trademarks and to sell products derived from ATCC® culture. </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="text-align: center;">  <p>TESTING CERT #2655.01</p> </div> <div style="font-size: small;"> (1) These tests are accredited to ISO/IEC 17025:2005. </div> </div>	

ANEXO N°19
CERTIFICADO DE ANÁLISIS FISCOQUÍMICO DEL PROPÓLEOS
PROVENIENTE DE AREQUIPA



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN AGUSTÍN DE AREQUIPA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y FORMALES
Unidad de Producción de Bienes y Prestación de Servicios
Laboratorio SERVILAB



INFORME DE ENSAYO FISICO QUIMICO

N° DE REPORTE: 16450-16

NOMBRE DEL CLIENTE	: KARING KATHERINE CALLA CARBAJAL - DIANA KATHERIN QUISPE TICONA
DIRECCIÓN	: AREQUIPA
ASUNTO	: ANÁLISIS FISICO QUIMICO
PRODUCTO	: PROPOLEOS
CANTIDAD DE MUESTRAS	: 01
LUGAR Y FECHA DE RECEPCIÓN	: AREQUIPA, 2016-05-12
CARACTERÍSTICAS Y CONDICIONES	: FRASCO OSCURO
FECHA DE ENTREGA DE RESULTADOS	: AREQUIPA, 2016-05-20
REFERENCIA	: MUESTRA PROPORCIONADA POR EL CLIENTE
PROCEDENCIA	: AREQUIPA
OBRA	:
CODIGO DE REGISTRO DE MUESTRA	: 21540

- LOS RESULTADOS OBTENIDOS CORRESPONDEN AL ANÁLISIS SOLICITADO EN LA MUESTRA RECIBIDA.
- ESTE FORMATO NO SERÁ REPRODUCIDO SIN AUTORIZACIÓN DEL LABORATORIO SERVILAB

PAGINA 1 DE 2

SERVILAB
SERVICIOS QUÍMICOS EN GENERAL
Pabellón MARIANO E. DE RIVERO Y USTARIZ (QUÍMICA)
Av. Independencia s/n • Ciudad Universitaria • Laboratorio 108 (Primer Piso)
Teléfono:(054) 220360 e-mail: upbs.servilab@hotmail.com
Arequipa - Perú

CERTIFICADO DE ANÁLISIS FISCOQUÍMICO DEL PROPÓLEOS PROVENIENTE DE AREQUIPA



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN AGUSTÍN DE AREQUIPA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y FORMALES
Unidad de Producción de Bienes y Prestación de Servicios
Laboratorio SERVILAB



INFORME DE ENSAYO


N° DE REPORTE: 16450-16

DETERMINACIÓN DE :					
Humedad	%	3,92			
Cenizas	%	4,66			
Grasa	%	14,72			
Análisis Organoléptico.					
Olor		Aromático			
Color		Pardo			
Sabor		Amargo			
Aspecto		Trozos semiduros			
OBSERVACIONES:					

METODO DE ENSAYO	
DETERMINACIÓN	METODO DE ENSAYO APLICADO NORMA /REFERENCIA / NOMBRE
Humedad	Método NTP 209.008
Cenizas	Método NTP 209.005
Grasa	Método NTP 209.093
Análisis Organoléptico	Método Sensorial.

Emitido en Arequipa (Perú), el 20 de Mayo del 2016

AGINA 2 DE 2


Dr. Juan Reyes Larico
Jefe de Laboratorio
RCQP - 348




Lid. Fredy Valdivia Peña
Químico Responsable
RCQP - 842

SERVILAB
SERVICIOS QUÍMICOS EN GENERAL
Pabellón MARIANO E. DE RIVERO Y USTARIZ (QUÍMICA)
Av. Independencia s/n • Ciudad Universitaria • Laboratorio 108 (Primer Piso)
Teléfono:(054) 220360 e-mail: upbs.servilab@hotmail.com
Arequipa - Perú

ANEXO N°20
CERTIFICADO DE ANÁLISIS FISCOQUÍMICO DEL PROPÓLEOS
PROVENIENTE DE CUSCO



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN AGUSTÍN DE AREQUIPA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y FORMALES
Unidad de Producción de Bienes y Prestación de Servicios
Laboratorio **SERVILAB**



INFORME DE ENSAYO FISICO QUIMICO

N° DE REPORTE: 16451-16

NOMBRE DEL CLIENTE	: KARING KATHERINE CALLA CARBAJAL – DIANA KATHERIN QUISPE TICONA
DIRECCIÓN	: AREQUIPA
ASUNTO	: ANÁLISIS FISICO QUIMICO
PRODUCTO	: PROPOLEOS
CANTIDAD DE MUESTRAS	: 01
LUGAR Y FECHA DE RECEPCIÓN	: AREQUIPA, 2016-05-12
CARACTERÍSTICAS Y CONDICIONES	: FRASCO OSCURO
FECHA DE ENTREGA DE RESULTADOS	: AREQUIPA, 2016-05-20
REFERENCIA	: MUESTRA PROPORCIONADA POR EL CLIENTE
PROCEDENCIA	: CUSCO
OBRA	
CODIGO DE REGISTRO DE MUESTRA	: 21541

- LOS RESULTADOS OBTENIDOS CORRESPONDEN AL ANÁLISIS SOLICITADO EN LA MUESTRA RECIBIDA.
- ESTE FORMATO NO SERÁ REPRODUCIDO SIN AUTORIZACIÓN DEL LABORATORIO SERVILAB

PAGINA 1 DE 2

SERVILAB
SERVICIOS QUÍMICOS EN GENERAL
Pabellón MARIANO E. DE RIVERO Y USTARIZ (QUÍMICA)
Av. Independencia s/n • Ciudad Universitaria • Laboratorio 108 (Primer Piso)
Teléfono: (054) 220360 e-mail: upbs.servilab@hotmail.com
Arequipa - Perú

**CERTIFICADO DE ANÁLISIS FISCOQUÍMICO DEL PROPÓLEOS
PROVENIENTE DE CUSCO**



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN AGUSTÍN DE AREQUIPA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y FORMALES
Unidad de Producción de Bienes y Prestación de Servicios
Laboratorio SERVLAB



INFORME DE ENSAYO

Nº DE REPORTE: 16451-16

DETERMINACIÓN DE :					
Humedad	%	3,74			
Cenizas	%	1,63			
Grasa	%	41,09			
Análisis Organoléptico.					
Olor		Resinoso			
Color		Pardo Oscuro			
Sabor		Insípido			
Aspecto		Trozos semiduros			
OBSERVACIONES:					

DETERMINACIÓN		METODO DE ENSAYO
		METODO DE ENSAYO APLICADO
		NORMA /REFERENCIA / NOMBRE
Humedad		Método NTP 209.008
Cenizas		Método NTP 209.005
Grasa		Método NTP 209.093
Análisis Organoléptico		Método Sensorial.

Emitido en Arequipa (Perú), el 20 de Mayo del 2016

AGINA 2 DE 2

Dr. Juan Reyes Larico
Jefe de Laboratorio
RCQP - 348



Lic. Fredy Valdivia Peña
Químico Responsable
RCQP - 842

SERVLAB
SERVICIOS QUÍMICOS EN GENERAL
Pabellón MARIANO E. DE RIVERO Y USTARIZ (QUÍMICA)
Av. Independencia s/n · Ciudad Universitaria · Laboratorio 108 (Primer Piso)
Teléfono:(054) 220360 e-mail: upbs.servilab@hotmail.com
Arequipa - Perú

ANEXO N°21
CERTIFICADO DE ANÁLISIS FISCOQUÍMICO DEL PROPÓLEOS
PROVENIENTE DE TACNA



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN AGUSTÍN DE AREQUIPA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y FORMALES
Unidad de Producción de Bienes y Prestación de Servicios
Laboratorio SERVILAB



INFORME DE ENSAYO FISICO QUIMICO

N° DE REPORTE: 16452-16

NOMBRE DEL CLIENTE	: KARING KATHERINE CALLA CARBAJAL – DIANA KATHERIN QUISPE TICONA
DIRECCIÓN	: AREQUIPA
ASUNTO	: ANÁLISIS FISICO QUIMICO
PRODUCTO	: PROPOLEOS
CANTIDAD DE MUESTRAS	: 01
LUGAR Y FECHA DE RECEPCIÓN	: AREQUIPA, 2016-05-12
CARACTERÍSTICAS Y CONDICIONES	: FRASCO OSCURO
FECHA DE ENTREGA DE RESULTADOS	: AREQUIPA, 2016-05-20
REFERENCIA	: MUESTRA PROPORCIONADA POR EL CLIENTE
PROCEDENCIA	: TACNA
OBRA	
CODIGO DE REGISTRO DE MUESTRA	: 21542

- LOS RESULTADOS OBTENIDOS CORRESPONDEN AL ANÁLISIS SOLICITADO EN LA MUESTRA RECIBIDA.
- ESTE FORMATO NO SERÁ REPRODUCIDO SIN AUTORIZACIÓN DEL LABORATORIO SERVILAB

PAGINA 1 DE 2

SERVILAB
SERVICIOS QUÍMICOS EN GENERAL
Pabellón MARIANO E. DE RIVERO Y USTARIZ (QUÍMICA)
Av. Independencia s/n • Ciudad Universitaria • Laboratorio 108 (Primer Piso)
Teléfono: (054) 220360 e-mail: upbs.servilab@hotmail.com
Arequipa - Perú

CERTIFICADO DE ANÁLISIS FISCOQUÍMICO DEL PROPÓLEOS PROVENIENTE DE TACNA



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN AGUSTÍN DE AREQUIPA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y FORMALES
Unidad de Producción de Bienes y Prestación de Servicios
Laboratorio SERVILAB



INFORME DE ENSAYO

N° DE REPORTE: 16452-16

DETERMINACIÓN DE :				
Humedad	%	3,44		
Cenizas	%	1,90		
Grasa	%	13,10		
Análisis Organoléptico.				
Olor		Resinoso		
Color		Pardo verdoso		
Sabor		Ligeramente amargo		
Aspecto		Trozos semiduros		
OBSERVACIONES:				

METODO DE ENSAYO	
DETERMINACIÓN	METODO DE ENSAYO APLICADO NORMA /REFERENCIA / NOMBRE
Humedad	Método NTP 209.008
Cenizas	Método NTP 209.005
Grasa	Método NTP 209.093
Análisis Organoléptico	Método Sensorial.

Emitido en Arequipa (Perú), el 20 de Mayo del 2016

AGINA 2 DE 2

Dr. Juan Reyes Larico
Jefe de Laboratorio
RCQP - 348



Lic. Fredy Valdivia Peña
Químico Responsable
RCQP - 842

SERVILAB
SERVICIOS QUÍMICOS EN GENERAL
Pabellón MARIANO E. DE RIVERO Y USTARIZ (QUÍMICA)
Av. Independencia s/n • Ciudad Universitaria • Laboratorio 108 (Primer Piso)
Teléfono: (054) 220360 e-mail: upbs.servilab@hotmail.com
Arequipa - Perú

ANEXO N°22
Determinación de la CIM del extracto etanólico de propóleos frente a
***Staphylococcus aureus*.**

1. Datos del método de dilución en caldo

Cepa de <i>Staphylococcus aureus</i>	Concentración del extracto etanólico de propóleos (mg/mL)											CIM	
	125.0	112.5	100.0	87.5	75.0	62.5	50.0	37.5	25.0	12.5	Contro l +		
A R E Q U I P A	ATCC	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	75.0
	1	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	75.0
	2	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	100.0
	3	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	75.0
	4	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	75.0
	5	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	75.0
	6	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	87.5
	7	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	75.0
	8	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	87.5
	9	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	100.0
	10	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	87.5
	\bar{x}												83.0
σ												10.1	
C U S C O	ATCC	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	62.5	
	1	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	62.5	
	2	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	75.0	
	3	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	62.5	
	4	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	62.5	
	5	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	62.5	
	6	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	62.5	
	7	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	62.5	
	8	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	62.5	
	9	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	75.0	
	10	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	62.5	
	\bar{x}											64.8	
σ											5.1		
T A C N A	ATCC	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	75.0	
	1	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	75.0	
	2	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	100.0	
	3	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	75.0	
	4	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	87.5	
	5	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	87.5	
	6	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	87.5	
	7	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	87.5	
	8	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	87.5	
	9	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	100.0	
	10	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	87.5	
	\bar{x}											86.4	
σ											8.8		

(+): Tubo con crecimiento bacteriano

(-): Tubo sin crecimiento bacteriano

Fuente: elaboración propia

2. ANOVA

Fuente de Variación	GL	SC	CM	F	P
Entre Grupos	2	2964.02	1482.01	21.74	<0.05
Dentro Grupos	30	2045.45	68.1818		
Total	32	5009.47			

3. Prueba de Tukey

Origen geográfico	Cantidad	Promedio	Grupos homogéneos
Cusco	11	64.8	X
Arequipa	11	83.0	X
Tacna	11	86.4	X

ANEXO N° 23

Determinación de la CIM del extracto etanólico de propóleos frente a *Candida albicans*.

1. Datos del método de dilución en caldo

Cepa de <i>Candida albicans</i>		Concentración del extracto etanólico de propóleos (mg/mL)											CIM
		125.0	112.5	100.0	87.5	75.0	62.5	50.0	37.5	25.0	12.5	Control +	
A R E Q U I P A	ATCC	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	75.0
	1	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	87.5
	2	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	100.0
	3	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	87.5
	4	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	87.5
	5	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	100.0
	6	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	100.0
	7	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	87.5
	8	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	100.0
	9	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	100.0
	10	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	87.5
	\bar{x}												92.0
σ												8.4	
C U S C O	ATCC	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	62.5	
	1	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	75.0	
	2	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	87.5	
	3	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	75.0	
	4	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	75.0	
	5	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	62.5	
	6	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	62.5	
	7	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	62.5	
	8	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	75.0	
	9	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	75.0	
	10	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	62.5	
	\bar{x}											70.5	
σ											8.4		
T A C N A	ATCC	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	75.0	
	1	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	87.5	
	2	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	87.5	
	3	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	87.5	
	4	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	87.5	
	5	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	87.5	
	6	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	75.0	
	7	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	87.5	
	8	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	87.5	
	9	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	100.0	
	10	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	75.0	
	\bar{x}											85.2	
σ											7.5		

(+): Tubo con crecimiento bacteriano

(-): Tubo sin crecimiento bacteriano

Fuente: elaboración propia

2. ANOVA

Fuente de Variación	GL	SC	CM	F	P
Entre Grupos	2	2679.92	1339.96	20.21	<0.05
Dentro Grupos	30	1988.64	66.2879		
Total	32	4668.56			

3. Prueba de Tukey

Origen geográfico	Cantidad	Promedio	Grupos homogéneos
Cusco	11	70.5	X
Arequipa	11	92.0	X
Tacna	11	85.2	X

ANEXO N° 24
Determinación de la CBM del extracto etanólico de propóleos frente a
***Staphylococcus aureus*.**

1. Datos obtenidos de la determinación de CBM

Cepa de <i>Staphylococcus aureus</i>		Concentración del extracto etanólico de propóleos (mg/mL)											CBM
		125.0	112.5	100.0	87.5	75.0	62.5	50.0	37.5	25.0	12.5	Control +	
A R E Q U I P A	ATCC	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	87.5
	1	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	75.0
	2	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	100.0
	3	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	87.5
	4	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	75.0
	5	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	75.0
	6	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	87.5
	7	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	75.0
	8	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	100.0
	9	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	100.0
	10	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	100.0
	\bar{x}												87.5
σ												11.2	
C U S C O	ATCC	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	75.0	
	1	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	62.5	
	2	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	75.0	
	3	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	62.5	
	4	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	62.5	
	5	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	62.5	
	6	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	75.0	
	7	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	62.5	
	8	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	62.5	
	9	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	75.0	
	10	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	75.0	
	\bar{x}											68.2	
σ											6.5		
T A C N A	ATCC	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	75.0	
	1	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	75.0	
	2	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	112.5	
	3	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	112.5	
	4	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	112.5	
	5	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	87.5	
	6	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	87.5	
	7	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	87.5	
	8	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	87.5	
	9	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	112.5	
	10	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	100.0	
	\bar{x}											95.5	
σ											15.1		

(+): Placa con crecimiento bacteriano

(-): Placa sin crecimiento bacteriano

Fuente: elaboración propia

2. ANOVA

Fuente de Variación	GL	SC	CM	F	P
Entre Grupos	2	4327.65	2163.83	16.44	<0.05
Dentro Grupos	30	3948.86	131.629		
Total	32	8276.52			

3. Prueba de Tukey

Origen geográfico	Cantidad	Promedio	Grupos homogéneos
Cusco	11	68.2	X
Arequipa	11	87.5	X
Tacna	11	95.5	X

ANEXO N° 25

Determinación de la CFM del extracto etanólico de propóleos frente a *Candida albicans*.

1. Datos obtenidos de la determinación de CFM

Cepa de <i>Candida albicans</i>	Concentración del extracto etanólico de propóleos (mg/mL)											CFM	
	125.0	112.5	100.0	87.5	75.0	62.5	50.0	37.5	25.0	12.5	Control +		
A R E Q U I P A	ATCC	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	75.0
	1	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	87.5
	2	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	100.0
	3	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	100.0
	4	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	87.5
	5	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	100.0
	6	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	100.0
	7	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	100.0
	8	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	100.0
	9	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	100.0
	10	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	87.5
\bar{x}												94.3	
σ												8.6	
C U S C O	ATCC	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	75.0
	1	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	100.0
	2	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	100.0
	3	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	87.5
	4	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	87.5
	5	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	87.5
	6	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	87.5
	7	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	87.5
	8	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	100.0
	9	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	87.5
	10	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	87.5
\bar{x}												89.8	
σ												7.5	
T A C N A	ATCC	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	100.0
	1	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	112.5
	2	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	100.0
	3	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	100.0
	4	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	100.0
	5	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	112.5
	6	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	112.5
	7	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	100.0
	8	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	100.0
	9	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	112.5
	10	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	100.0
\bar{x}												104.5	
σ												6.3	

(+): Placa con crecimiento bacteriano

(-): Placa sin crecimiento bacteriano

Fuente: elaboración propia

2. ANOVA

Fuente de Variación	GL	SC	CM	F	P
Entre Grupos	2	1259.47	629.73	11.08	<0.05
Dentro Grupos	30	1704.55	56.82		
Total	32	2964.02			

3. Prueba de Tukey

Origen geográfico	Cantidad	Promedio	Grupos homogéneos
Cusco	11	89.8	X
Arequipa	11	94.3	X
Tacna	11	104.5	X

ANEXO N° 26
Determinación de la sensibilidad antimicrobiana del extracto etanólico de propóleos frente a *Staphylococcus aureus*.

1. Datos del método de difusión de discos

Cepa de <i>S. aureus</i>	Concentración del extracto etanólico de propóleos (mg/mL)											
	Arequipa				Cusco				Tacna			
	50	100	150	250	50	100	150	250	50	100	150	250
ATCC	16	17	22	34	18	24	33	36	14	16	21	34
1	15	16	20	31	17	22	31	35	14	15	18	28
2	12	14	18	27	15	19	27	31	12	13	16	26
3	14	15	18	27	15	19	26	30	13	14	16	26
4	14	15	19	30	17	24	33	36	13	14	18	27
5	11	12	16	25	14	20	27	29	11	13	16	25
6	12	13	16	24	13	18	24	27	12	13	17	25
7	11	12	16	25	14	19	25	27	10	11	15	22
8	15	16	19	27	16	19	28	32	12	14	17	25
9	12	13	16	25	15	19	27	29	11	12	15	22
10	14	15	19	29	16	22	30	33	13	15	19	27
\bar{x}	13	14	18	28	15	20	28	31	12	14	17	26
σ	2	2	2	3	2	2	3	3	1	1	2	3

2. Análisis de varianza de dos factores con una sola muestra por grupo

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Concentración	4160.88	3	1386.96	193.71	<0.05
B:Procedencia	11.0929	2	554.64	77.46	<0.05
Residual	902.17	126	7.16		
TOTAL (CORREGIDO)	6172.33	131			

3. Prueba de Tukey

3.1. Halo de inhibición vs origen geográfico

Origen geográfico	Cantidad	Promedio	Grupos homogéneos
Tacna	44	17.27	X
Arequipa	44	18.34	X
Cusco	44	23.89	X

3.2. Halo de inhibición vs concentración

Concentración	Cantidad	Promedio	Grupos homogéneos
50	33	13.67	X
100	33	16.15	X
150	33	21.15	X
250	33	28.36	X

ANEXO N° 27
Determinación de la sensibilidad antimicrobiana del extracto etanólico de propóleos frente a *C. albicans*.

1. Datos del método de difusión de discos

Cepa de <i>C. Albicans</i>	Concentración del extracto etanólico de propóleos (mg/mL)											
	Arequipa				Cusco				Tacna			
	50	100	150	250	50	100	150	250	50	100	150	250
ATCC	14	16	20	26	16	19	24	30	11	15	19	26
1	12	15	19	24	15	18	22	29	9	13	17	25
2	11	13	16	19	13	16	18	23	10	14	17	18
3	12	15	20	24	14	18	21	27	9	14	20	21
4	13	16	19	25	15	18	22	28	10	15	19	23
5	11	15	19	24	15	18	22	28	9	12	16	19
6	11	14	16	21	14	16	19	25	9	11	15	19
7	13	16	19	25	16	19	23	29	10	14	18	23
8	12	14	17	21	13	16	19	26	9	12	16	18
9	14	16	18	20	14	17	21	26	9	13	16	19
10	14	16	20	23	15	19	23	28	11	15	19	23
\bar{x}	12	15	18	23	15	18	21	27	10	13	17	21
σ	1	1	2	2	1	1	2	2	1	1	2	3

2. Análisis de varianza de dos factores con una sola muestra por grupo

Fuente	Suma de Cuadrados	GL	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A: Concentración	2452.51	3	817.50	282.97	<0.05
B:Procedencia	496.77	2	248.39	85.98	<0.05
Residual	364.02	126	2.89		
TOTAL (CORREGIDO)	3313.30	131			

3. Prueba de Tukey

3.1. Halo de inhibición vs origen geográfico

Origen geográfico	Cantidad	Promedio	Grupos homogéneos
Tacna	44	15.45	X
Arequipa	44	17.23	X
Cusco	44	20.16	X

3.2. Halo de inhibición vs concentración

Concentración	Cantidad	Promedio	Grupos homogéneos
50	33	12.21	X
100	33	15.39	X
150	33	19.06	X
250	33	23.79	X