



UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS

ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA

Eficacia antimicrobiana del extracto etanólico del propóleo sobre cepas de
Salmonella typhi: Estudio *in vitro*

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE
MÉDICO CIRUJANO**

AUTORA:

ALARCÓN RUIZ, Sairah Elizabeth

ASESORES:

Dr. BENITES CASTILLO, Santiago

Dr. ÁLVAREZ BAGLIETTO, Carlos

LINEA DE INVESTIGACIÓN

Medicina Alternativa

**TRUJILLO – PERÚ
2016**

Mg. Jaime Polo Gamboa

Dr. Miguel Ibañez Reluz

Dra. Amalia Vega Fernandez

DEDICATORIA

En primer lugar esta tesis se la dedico a Dios quien supo darme la fuerza de seguir adelante y no rendirme ante los problemas que generaban, enseñándome a superarlas sin perder nunca la fe ni quedar en el intento.

Al ángel de mi Padre que desde el cielo me empuja a seguir con las metas que me propongo, a mi Madre que me ofrece sus consejos, comprensión, amor, apoyo en los momentos difíciles, y por brindarme los recursos tan necesarios para culminar mi carrera y a mis Hermanos quienes me apoyan incondicionalmente.

AGRADECIMIENTO

A mi Madre que me brindó su apoyo y valioso tiempo para la realización del experimento cuando me encontraba saturada.

A mi maestra asesora de trabajo de tesis a la Dra. Amalia Vega Fernández que me brindó su apoyo, su comprensión y paciencia para la realización del presente trabajo, así como también al Prof. Carlos Tapia por su asesoría estadística.

A mi asesor de tesis Dr. Santiago Benites por su paciencia y apoyo constante durante la ejecución del presente trabajo.

DECLARATORIA DE AUTOTENCIDAD

Yo, Alarcón Ruiz Sairah Elizabeth identificada con DNI N° 71204400, interna de medicina año 2016 del Hospital Regional Docente Trujillo, que para cumplir con el Reglamento de Títulos de la Universidad Cesar Vallejo, Facultad de Ciencias Médicas de la Escuela de Medicina humana, declaro bajo juramento y doy mi palabra que este trabajo es veraz y autentico.

Esta investigación ha sido realizada para la obtención de un título profesional no ha sido antes sustentada por otra persona.

Por lo cual bajo toda la responsabilidad ante cualquier plagio, ocultamiento u omisión sobre la información brindada en mi trabajo, seré sometido a las reglas académicas.

PRESENTACIÓN

Actualmente el uso de productos naturales en salud están teniendo mucha relevancia para su uso en la salud, los conocimientos de aquellos se han transmitido de generación en generación y se han ido descubriendo a través del tiempo, los que mayor mente son utilizados son los extractos que pueden ser de plantas o árboles. En cuanto al propóleo, producto resinoso, preparado por las abejas con distintos materiales que ellas recolectan; es preparado para utilizarlo como apoyo para las estructuras de sus colmenas, cubren su interior y así no permiten el ingreso de algún agente extraño y su contaminación, además también sirve para controlar la temperatura de su colonia. La apicultura es una actividad de la cual el principal producto es la miel, y su subproducto el propóleo, que por sus efectos medicinales se están usando para elaborar compuestos para el tratamiento de afecciones provocadas por diferentes microorganismos, a base de extracto etanólico pues se ha demostrado una mayor eficacia de esta presentación, teniendo efecto bactericida contra *Salmonella enteritidis* y *S. typhimurium*, siendo la *Salmonella typhi*, agente etiológico de la fiebre tifoidea, con cifras registradas solo en la región de Lambayeque reportando 14 casos (11 femeninos), teniendo en cuenta que en Perú, solo el 38% de hogares tienen acceso a agua y que la incidencia persiste. Por ello nos preguntamos ¿Cuál es la eficacia antimicrobiana del extracto etanólico de propóleo sobre cepas de *Salmonella typhi*?, para poder determinar la eficacia antimicrobiana del extracto etanólico de propóleo sobre cepas de *Salmonella typhi*, analizando el efecto que tiene cada tipo de extracto sobre el crecimiento de cepas de *Salmonella typhi*, se desarrollara a través de diseño experimental, con post prueba y grupo control teniendo nuestras hipótesis que La eficacia antimicrobiana del extracto etanólico de propóleos es mayor al ciprofloxacino sobre cepas de *Salmonella typhi* o que la eficacia antimicrobiana del extracto etanólico de propóleo es menor o igual al ciprofloxacino sobre cepas de *Salmonella typhi*, los cuales se observaran y corroboraran con los resultados obtenidos.

INDICE

Página del jurado.....	i
Dedicatoria.....	ii
Agradecimiento.....	iii
Declaratoria de autenticidad.....	iv
Presentación	v
RESUMEN	viii
ABSTRACT.....	ix
I. INTRODUCCIÓN.....	11
1.1. Realidad problemática	11
1.2. Trabajos previos.....	12
1.3. Teorías relacionadas al tema.....	144
1.4. Formulación del problema	20
1.5. Justificación del estudio	20
1.6. Hipótesis.....	20
1.7. Objetivos.....	21
II. METODO	22
2.1. Diseño de Investigación.....	22
2.2. Variables, operacionalización	23
2.3. Población y muestra	24
2.4. Técnica e instrumentos de recolección de datos.....	26
2.5. Método de análisis de datos	26
2.6. Aspectos éticos	28
III. RESULTADOS	29
IV. DISCUSIÓN.....	30
V. CONCLUSIONES	35

VI. RECOMENDACIONES.....	376
VII. REFERENCIAS	37

RESUMEN

Se ha evaluado la eficacia antimicrobiana del extracto etanólico de propóleos obtenido del departamento de Lambayeque (de los Bosques secos de Pomac) facilitando la adquisición por el centro de apicultura “Honey Bee”, en Trujillo. Se usaron cepas de *Salmonella typhi*, germen Gram negativo. La inhibición del crecimiento bacteriano se medirá a través del halo de inhibición utilizando el método de Kirby Bauer donde se evidenció que con una concentración al 80% es eficaz totalmente, con una actividad antimicrobiana dependiente de la concentración del extracto. En conclusión el extracto etanólico de propóleo si presenta una actividad antibacteriana significativa y esta actividad depende de su concentración de etanol para la producción de extracto.

Palabras clave: Eficacia antimicrobiana, extracto etanólico, propóleos, *Salmonella typhi*.

ABSTRACT

The antimicrobial efficacy of the ethanol extract of propolis obtained from the department of Lambayeque (of dry forests Pomac) has been evaluated, facilitating the acquisition by the central beekeeping "Honey Bee" in Trujillo. Strains of *Salmonella typhi*, Gram-negative germ used. Inhibition of bacterial growth is mediated through the inhibition halo using the Kirby Bauer method where it is shown that at a concentration of 80%, it is completely effective, with an antimicrobial activity dependent on the concentration of the extract. In conclusion the ethanolic extract of propolis has an antibacterial activity and this activity depends on its concentration of ethanol for the production of extract.

Keywords: Antimicrobial efficacy, ethanolic extract, propolis, *Salmonella typhi*

I. INTRODUCCIÓN

1.1. REALIDAD PROBLEMÁTICA

El género *Salmonella* comprende bacterias que pertenecen a la familia Enterobacteriaceae, que se caracterizan por ser bacilos de corta longitud, Gram negativos, no esporulados y anaerobias facultativas. Además son oxidasa negativa, y la mayoría son móviles por la presencia de flagelos peritricos¹.

Estos microorganismos poseen como principal reservorio el intestino de los animales que tienen temperatura uniforme y los animales que carecen de mecanismos reguladores de la temperatura. A pesar de no disponer de estructuras de resistencia, manifiestan una elevada capacidad de supervivencia en el medio ambiente. Mantienen su viabilidad y su capacidad infectiva durante varias semanas en el agua e incluso durante años en el suelo.¹

Salmonella typhi causa la fiebre tifoidea, la cual se constituye en un problema relevante para los países que se encuentran en camino de desarrollo, pues según estimaciones del Organismo Mundial de la Salud (OMS) tanto en el mundo como en América Latina² y en Perú, la cifra estimada es de 3 mil casos al año, según la vigilancia epidemiológica de la región de Lambayeque en enero del 2014³.

Una característica destacable de *Salmonella thypi* es el aumento de la resistencia a antibióticos a nivel mundial que muestra especialmente a cloranfenicol, ampicilina, trimetoprim-sulfametoxazol, ciprofloxacino y tetraciclinas. Esta resistencia disminuye la posibilidad de éxito en tratamiento, incrementando los costos del mismo y la incidencia de complicaciones y fallecimientos².

El propóleo es un material resinoso producido por las abejas melíferas a partir de las yemas y exudados de plantas, que colectado, es enriquecido con secreciones salivares y enzimáticas de éstos insectos, el mismo que es usado también para construir y reparar las colmenas, pero que también es empleado para erradicar las infecciones contra los microorganismos patógenos³.

En muchos países el propóleo es utilizado como medicamento homeopático en el tratamiento de infecciones respiratorias, pero adicionalmente se analizó la actividad antibacteriana contra varios agentes, entre ellos *Salmonella typhi*; por ello, el propóleo constituye una alternativa que puede ser útil en el tratamiento de estas infecciones, entre ellas la fiebre tifoidea⁴.

Dada la relevancia de infecciones por *Salmonella* y siendo necesaria su evaluación antimicrobiana a fin de brindar una opción terapéutica a quienes buscan remedios naturales en vez de lo farmacológico, se cree conveniente realizar el presente trabajo de investigación.

1.2. TRABAJOS PREVIOS

Preeti, K. et al.⁵ (India 2014), realizaron una investigación donde se evaluó el potencial terapéutico de propóleo contra los daños causados por *Salmonella typhimurium* en el hígado: estudio histológico, en ratones infectados con un peso de 20-25g con fiebre tifoidea, dividiéndoles en seis grupos, describiendo el comportamiento de la cepa de *Salmonella typhimurium* cultivada en caldo nutritivo durante la noche a 37°C, resultando que la carga bacteriana en el grupo infectado y no superviviente fue bastante alta, un 15 a 30% por día, a diferencia del grupo tratado con propóleo en extracto con alcohol 70%, que al final de los 30 días el recuento disminuyó considerablemente ($p < 0.050$).

Suárez, H. et al.⁶ (Colombia, 2013), realizaron una investigación sobre la determinación de los parámetros microbiológicos y sensorial de filetes de pescado preservados con propóleos bajo refrigeración, donde se determina la capacidad conservante del propóleos en los filetes de “cachema”, durante el almacenamiento bajo refrigeración, utilizando extractos etanólicos de propóleos (EEP) 0.8% y 1.2% con etanol al 96% para analizar la actividad antimicrobiana frente a *Salmonella spp.* El resultado fue, un halo de inhibición de 15 y 16 mm, respectivamente y un control de EEP aceptables, sobre los microorganismos utilizados ($p>0.05$), concluyendo que EEP son efectivos con el control de bacterias Gram positivas y algunas Gram negativas presentes en filetes de “cachema” y, serían una opción para evitar el uso de conservantes químicos.

Aygum, A. et al.⁷ (Turquía, 2012), realizaron el estudio de los efectos antimicrobianos de propóleos del cascarón, incubilidad y rendimiento en huevos de codorniz japonesa (*Coturnix coturnix japónica*), estableciendo los efectos del propóleos para controlar la actividad antimicrobiana que ocurre de forma natural. Para ello, se dividió un total de 750 huevos frescos en 5 grupos, donde el tercer, cuarto y quinto grupo se le roció propóleos en 3 dosis: 5%, 10% y 15%, con alcohol etanol del 70%. La actividad antimicrobiana en los huevos rociados con propóleos se redujo significativamente ($p<0.001$).

Gutiérrez, C. et al.⁸ (Colombia, 2012), realizaron un estudio sobre el efecto conservante de propóleos en chorizos, donde el extracto etanólico del propóleo fue utilizado en una prueba de difusión para determinar su capacidad inhibitoria frente a *Salmonella sp. in vitro*. Como resultados, se observó la inhibición del microorganismo con las concentraciones de extracto etanólico utilizadas (etanol al 96%), pero no se encontraron diferencias significativas ($p>0.05$) entre las concentraciones de 0.8, 1.2 y 1.6 mg/mL. Se observó halo de inhibición a partir de 8mm de diámetro, y

además se evidenció actividad bactericida y bacteriostática de EEP a 0.6 mg/mL.

Gil M. et al.⁹ (Venezuela 2012), evaluaron la actividad bacteriostática y bactericida de tintura de propóleos sobre bacterias enteropatógenas. Se estudió la concentración mínima inhibitoria y la concentración mínima bactericida, utilizando el método de macro dilución en tubos. Resultados: la *Salmonella paratyphi* A, la única que evidenció un efecto inhibitorio total en agar BHI y en el resto de las bacterias solo efecto bacteriostático parcial. La *Salmonella typhi* fue sensible con CMI 8% y *Salmonella paratyphi* A fueron las más resistente con CMB 15 %.

Carrillo M. et al.¹⁰ (México 2011), evaluaron la actividad antimicrobiana de extractos de los extractos etanólicos y acuosos de propóleos, identificando la concentración mínima bactericida de cada extracto con el método de dilución en tubo, resultando que los extractos etanólicos (CMB: 0.93 mg mL⁻¹ para Gram positivas, y 7.5 mg mL⁻¹ para Gram negativas) tienen una mayor actividad antibacteriana que los extractos acuosos (CMB: 20 mg mL⁻¹ Gram positivas y 30 mg mL⁻¹ para Gram negativas), lo cual significa que no hubo diferencias significativas ($p > 0.01$); dentro de las Gram negativas como la *Salmonella typhi*, se observó mayor actividad antimicrobiana con una mayor concentración de extracto para inhibir el crecimiento de las bacterias ($p \leq 0.0001$).

1.3. TEORÍAS RELACIONADAS AL TEMA

El género *Salmonella*, de la familia Enterobacteriaceae, está integrado por gérmenes de forma bacilar, gram negativas, anaerobios facultativos y no esporulados. Son a menudo patógenas para el ser humano y los animales cuando se adquieren por vía oral. Se transmiten por los animales, quienes sus productos llegan al hombre produciendo enteritis, infección general y fiebre intestinal. La longitud de las diversas especies varía. La mayor

parte, salvo *Salmonella pullorum-gallinarum*, son móviles y tienen flagelos peritricos. Estos microorganismos crecen fácil en medios sencillos, casi nunca fermentan la lactosa o la sacarosa. Forman ácido y a veces gas, a partir de la glucosa y manosa.¹¹ Solo consta de tres especies, *Salmonella typhi* (un serotipo), *S. choleraesuis* (un serotipo) y *S. enteritidis* (más de 1,500 serotipos, siendo estos los que causan 99% de la salmonelosis en humanos y animales superiores).¹¹

Salmonella producen cuatro formas de enfermedades en el hombre (gastroenteritis, septicemia, fiebre entérica y colonización asintomática), pero son frecuentes las formas mixtas: La fiebre entérica, producida por la *Salmonella typhi*; es una patología febril conocida como fiebre tifoidea¹¹. A diferencia del mecanismo para otras infecciones originadas por *Salmonella*, las bacterias responsables de la fiebre entérica se necesitan, por término medio, un inóculo mayor al millón de gérmenes, para poder alcanzar la barrera gástrica del estómago¹². Luego ingresan al intestino delgado, donde se instalan en su medio el cual es idóneo para su crecimiento, más aún si existe un barrido de la flora intestinal normal por el uso de antibióticos. Las bacterias, se adhieren a las vellosidades intestinales a través de receptores específicos quienes permiten que atraviesen la mucosa alcanzando posteriormente las placas de Peyer donde proliferan, pasan a la sangre y son fagocitados, acumulándose en el hígado, el bazo y la médula ósea. Finalmente, vuelven a pasar al intestino y a la vesícula biliar. En su camino, pueden ulcerar a las placas de Peyer, generando hemorragia o la perforación.¹²

Entre 10 y 14 días luego del ingreso de los bacilos, los pacientes empiezan a presentar fiebre la cual se incrementa de manera progresiva, se asocia también a síntomas generales como anorexia, cefalea y mialgias, las cuales tienen una duración aproximadamente de una semana, para posteriormente presentar molestias gastrointestinales. Este ciclo corresponde a la fase bacteriémica inicial, le sigue la fase de colonización de la vesícula biliar y finalmente la reinfección del intestino. La fiebre

entérica, es una enfermedad clínica grave, que se debe de sospechar en pacientes febriles.¹¹

Las manifestaciones clínicas y los datos epidemiológicos son útiles para el diagnóstico, pues nos permite tener una referencia de la etiología de la enfermedad, porque el diagnóstico se realiza a través del aislamiento de la *Salmonella typhi*, el cual se identifica a través de hemocultivos que suelen ser positivos a la primera semana en el 90% de los casos, disminuyendo su sensibilidad al pasar los días (50% en la tercera semana). También se puede aislar en la médula ósea y en lesiones de la piel.¹²

Dentro del fármaco al cual es sensible *Salmonella typhi*, está el ciprofloxacino, quinolona cuyo mecanismo de acción se dirige contra la ADN girasa bacteriana y la topoisomerasa IV. Para muchas bacterias grampositivas, la topoisomerasa IV es la actividad principal inhibitoria de las quinolonas. Por el contrario, la ADN girasa constituye el principal objetivo de las quinolonas en muchos gramnegativos. Son bactericidas potentes contra *E. coli*, *Campylobacter* y diversas especies de *Salmonella*, *Shigella*, *Enterobacter* y *Neisseria*, pues se administra vía oral teniendo buena absorción, siendo su concentración sérica máxima alrededor de las primeras 3 horas.²³

En el tratamiento, ciprofloxacino y ofloxacina erradica la mayoría de *S. typhi* en los pacientes con diarrea, así como infecciones distintas de la tifoidea en los pacientes con SIDA y elimina el estado de portador fecal crónico. Sin embargo tiene reacciones adversas en el aparato digestivo como náuseas leves, vómito y/o dolor abdominal.²⁴

El propóleo, es una resina cerosa, con complejos componentes, producida por las abejas *Apis mellifera* y ellas obtienen el material resinoso, gomoso o balsámico, por la suma de secreciones producidas de saliva y de cera, los cuales reúnen de yemas y heridas de variedades de plantas, como los

saucos, castaños, pinos, álamos, entre otros. En la colmena, las abejas usan al propóleo con el fin de cerrar grietas recubriendo las estructuras y barnizando el interior de las celdillas, disminuir las vías de acceso para evitar ingreso de agentes extraños y aislarlos de los demás animales, evitando su descomposición.¹³

Para la recolección la abeja empieza a desprender el propóleo con sus mandíbulas, además se ayuda de sus patas (su primer par). Cuando el clima es frío y la resina se encuentra dura y el insecto ablanda al propóleo con sus secreciones de sus glándulas localizadas en sus mandíbulas. Luego, rompe la porción obtenida y ayudándose de las patas del segundo par, la coloca en sus patas posteriores. Una vez finalizado, la abeja la lleva a su colmena y lo deja con las abejas receptoras. Cada colmena puede tener entre 150 y 300 gramos de propóleo por año, valor que puede modificarse dependiendo del ambiente, influyendo el clima, sus temperaturas, entre otros.¹⁴

Los estudios sobre la estructura química del propóleo reportan a los siguientes grupos químicos: ésteres, ácidos, ácidos grasos, aldehídos, amino ácidos, chalconas y dihidro-chalconas, flavanonas, flavonas, flavonoides, cetonas, terpenoides, esteroides y azúcares.¹⁵; y para poder identificarlos se usan técnicas sofisticadas, con las cuales se encontraron los compuestos orgánicos como los anteriormente descritos, además de alcoholes, esteroides, hidrocarburos, terpenoides, flavonoides, dentro de ellos: pinostrobin, sakurnetina; Flavonas: acacetina, crisina amarilla, pectolinarigenina, tectocrisina; Flavonoles: apigenin, tt-farnesol, galangina, izalquinina, kaempferido, quercetina, ramnocitrina y Flavononoles: pinobanksina.¹³

El grupo más importante de compuestos encontrado en propóleo son los denominados fenoles, que constituyen más del 50% del peso total. Las propiedades médicas del propóleo, son atribuidas principalmente a la presencia de estas sustancias, más aún, la literatura apunta que las

actividades están fuertemente relacionadas a los flavonoides, el principal compuesto fenólico del propóleo.¹⁶ Se caracteriza por su aspecto de esferas, pues se relaciona con el tipo de cosecha que se ha realizado para su obtención. El propóleo tiene un aspecto verdoso oscuro que puede llegar a ser amarillo-verdoso y pardo-rojizo, hasta negro, es aromático y algunos inodoros, su consistencia varía en cuanto a la temperatura expuesta, si es superior a 30°C es blando y menores de 15°C duro y quebradizo.¹⁷

Las características morfológicas del propóleo varían según la disponibilidad de las variedades vegetales y las condiciones ambientales. Por ello, su color puede variar, dependiendo de su origen y la edad.¹⁷ Presenta también una baja solubilidad en agua pero puede ser diluido en solventes como alcohol etílico, acetona, propilenglicol, benceno y soda cáustica; siendo el alcohol etílico el solvente más recomendado ya que permite extraer con más eficiencia los principios activos y bajas concentraciones de cera.¹⁸

Muchos profesionales están incrementando el uso de flavonoides puros para tratar muchas importantes enfermedades, debido a su comprobada habilidad de inhibir enzimas específicas, simular algunas hormonas y neurotransmisores, y eliminar radicales libres.¹⁹

Del carácter biológico del propóleo, destacan sus propiedades antimicrobianas contra bacterias Gram-positivas; sin embargo, tienen un efecto más bajo contra las bacterias Gram-negativas y una buena eficacia contra las levaduras, dependiendo del sinergismo entre algunos flavonoides, ácidos fenólicos y otros compuestos en los propóleos. El efecto antimicrobiano de los componentes orgánicos no está claro, pero las hipótesis planteadas relacionan a la inhibición de la motilidad bacteriana, efecto en el potencial de membrana, inhibición de la ARN-polimerasa, y desorganización del citoplasma, e inhibición de la síntesis de la proteína.²⁰

Los efectos orgánicos de algunas estructuras del propóleo, en lo que respecta a la pinocebrina, tiene una actividad antibacteriana, fungicida, además también se ha demostrado efecto como anestésico local; la acacetina, con efecto antiinflamatorias²¹, sin embargo se ha demostrado que es un inhibidor potente de las enzima de citocromo P450 (agente anticarcinogénico) al inducir directamente sobre la quinona reductasa y otras enzimas protectoras, no permitiendo la activación de otros agentes carcinógenos; galangina, que presenta efecto antioxidante y antimutagénica, por su actividad de retener radicales libres y además de modular a las enzimas metabólicas. ²¹

Dentro de las reacciones adversas de la aplicación tópica de propóleos es escasa y mayormente son reacciones alérgicas por hipersensibilidad (dermatitis de contacto). Se han reportado hasta la actualidad un promedio de 250 casos de alergias a propóleos, predominantemente en palmas, que se puede justificar por la manipulación de partes de la colmena que contienen propóleos, también se han reportado mucositis orales con lesiones tipo ulceraciones, debido a la ingesta de gotas de propóleos. El principal agente sensibilizante descubierto en el propóleos, corresponde a 3-metil-2-butenil cafeato y feniletil cafeato.²²

En nuestro país encontramos variedad de propóleos, el cual se caracteriza dependiendo de su ubicación de producción, donde influye la altura de la zona y si existe o no contaminación en su ubicación. Teniendo en cuenta que la producción de propóleos tiene bajo costo, no influye en el cuidado de la miel y que actualmente la demanda existente va en aumento en el mercado nacional e internacional del producto, por ello se estudia sus componentes. ¹⁵

1.4. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿Tiene eficacia antimicrobiana *in vitro* el extracto etanólico de propóleo sobre cepas de *Salmonella typhi*?

1.5. JUSTIFICACIÓN

La falta de estudios locales y nacionales sobre el efecto antimicrobiano del extracto etanólico del propóleo, especialmente sobre la bacteria *Salmonella typhi*, causante de la fiebre tifoidea, enfermedad de constante incidencia y prevalencia en el mundo, específicamente en países en camino al desarrollo y particularmente en nuestro país y Trujillo, motivó el interés para desarrollar la presente investigación.

El presente trabajo pretende determinar el efecto antimicrobiano *in vitro* del extracto etanólico peruano, sobre cepas de *Salmonella typhi*, buscando evaluar su eficacia teniendo como control positivo a uno de los antibióticos más usados en la práctica diaria como es el ciprofloxacino, con la finalidad de demostrar sus bondades antimicrobianas *in vitro* contra éste patógeno, buscando que ello quede de incentivo para iniciar una serie de actividades que ayuden a la realización de otros estudios que lleven a su empleo en la práctica clínica.

1.6. HIPÓTESIS

H1: El extracto etanólico de propóleos si tiene eficacia antimicrobiana *in vitro* sobre cepas de *Salmonella typhi*

H0: El extracto etanólico de propóleo no tiene eficacia antimicrobiana *in vitro* sobre cepas de *Salmonella typhi*.

1.7. OBJETIVOS

1.7.1 General:

- a) Determinar la eficacia antimicrobiana *in vitro* del extracto etanólico de propóleo sobre cepas de *Salmonella typhi*.

1.7.2 Específicos:

- a) Valorar el crecimiento bacteriano de cepas de *Salmonella typhi* frente al extracto etanólico de propóleo a diferentes concentraciones (60%, 70%, 80%, 90%) mediante la prueba de difusión en disco.
- b) Comparar el halo de inhibición de crecimiento de *Salmonella typhi* con extracto etanólico de propóleos y con ciprofloxacino.

II. METODO

2.1. Diseño de Investigación

El tipo de estudio del presente trabajo, según el análisis y alcance de los resultados fue experimental.

Fue *in vitro*, pues durante el estudio se crearon condiciones controladas y favorables en un laboratorio que nos permitió la ejecución del estudio.

Según periodo y secuencia del estudio fue prospectivo, pues los datos se analizaron transcurridos un tiempo determinado.

Diseño experimental, diseñada con post prueba y grupo control:

G1: X₁ – O₁

G2: X₂ – O₂

G3: X₃ – O₃

G4: X₄ – O₄

G5: X₅ – O₅

G6: X₆ - O₆

Donde:

G = Placas Petri con *Salmonella typhi*

X₁= Tratamiento con extracto etanólico de propóleo dilución de 60%

X₂= Tratamiento con extracto etanólico de propóleo dilución de 70%

X₃= Tratamiento con extracto etanólico de propóleo dilución de 80%

X₄= Tratamiento con extracto etanólico de propóleo dilución de 90%

X₅= Tratamiento control con ciprofloxacino

X₆= Tratamiento negativo con agua destilada

O₁, O₂, O₃, O₄, O₅, O₆= Observación post tratamiento de cepas de *Salmonella typhi*

2.2. Variables, operacionalización

Variable independiente:

Concentración del extracto etanólico de propóleo

Variable dependiente:

Eficacia antimicrobiana sobre cepas de *Salmonella typhi*

Variable	Definición Conceptual	Dimensión	Definición operacional	Indicadores	Escala de medición
Concentración del extracto etanólico de propóleo	Solución resultante del proceso de disolución del propóleo en un vehículo etanólico en una unidad de volumen determinada. ²⁶	Extracto etanólico propóleo	Se hará la medición mediante la Ficha de Observación, teniendo en cuenta la concentración del extracto etanólico de propóleo.	<ul style="list-style-type: none"> • 60 % • 70 % • 80 % • 90 % 	Cuantitativa de Razón
Eficacia antimicrobiana sobre cepas de <i>Salmonella typhi</i>	Efecto que se obtiene con el antimicrobiano para interferir en el crecimiento y la supervivencia de los microorganismos, el cual se realiza mediante una interacción específica con alguno de sus componentes celulares. ²⁶	Prueba de disco difusión	Medición del diámetro del halo de inhibición de los discos en la prueba de difusión de disco, según el estándar M02 – A11 del NCCLS. Y M100-S25	<ul style="list-style-type: none"> • Sensible (>=21) • Intermedio (17-20) • Resistente (<=16) 	Cualitativa ordinal

2.3. Población y muestra

2.3.1 Población:

La población, objeto de estudio, estuvo constituida por las cepas de *Salmonella typhi* cultivadas *in vitro*.

Unidad de análisis:

Cada placa Petri con cultivos de cepas de *Salmonella typhi* del laboratorio de la Facultad de Ciencias Médicas de la UCV.

Unidad muestral:

Placas Petri con cultivos de cepas de *Salmonella typhi* del laboratorio de la Facultad de Ciencias Médicas de la UCV.

2.3.2 Muestra:

Tamaño muestral:

Fue determinada mediante la fórmula estadística de estimación de una media en base a los datos obtenidos en la prueba piloto. Teniendo como valor de $m=8$.

$$n = \frac{2(Z\alpha + Z\beta)^2 S^2}{E^2}$$

n : Número de repeticiones a efectuar en cada investigación

$Z\alpha$: 1.96 (nivel de confianza 95%)

$Z\beta$: 0.842

S^2 : 0.90 (varianza según muestra de piloto)

$E = X_1 - X_2 = 21 - 21.7 = 0.7$ (Error)

Calculando la muestra de Piloto, se obtienen = 27.8, y como se tiene 5 grupos, obtendremos 139 muestras en total, además de las muestras control.

GRUPO 1: 28 repeticiones en placas Petri con siembra de *Salmonella typhi*, utilizando extracto etanólico de propóleo al 90%

GRUPO 2: 28 repeticiones en placas Petri con siembra de *Salmonella typhi*, utilizando extracto etanólico de propóleo al 80%

GRUPO 3: 28 repeticiones en placas Petri con siembra de *Salmonella typhi*, utilizando extracto etanólico de propóleo al 70%

GRUPO 4: 28 repeticiones en placas Petri con siembra de *Salmonella typhi*, utilizando extracto etanólico de propóleo al 60%

GRUPO 5: 28 repeticiones en placas Petri con siembra de *Salmonella typhi*, utilizando ciprofloxacino 500 mg

Las muestras se escogieron teniendo en cuenta los siguientes criterios de selección:

Los criterios de inclusión

Cepas de *Salmonella typhi* cultivadas *in vitro*

Cepas de *Salmonella typhi* que no tuvieron contacto con ningún tipo de medicamento o solución antimicrobiana.

Los criterios de exclusión

Cepas de *Salmonella typhi* que no pudieron ser cultivadas en medio *in vitro*.

Cepas de *Salmonella typhi* que tuvieron contacto con algún tipo de medicamento o solución antimicrobiana.

Cepa con algún grado de resistencia bacteriana

2.4. Técnica e instrumentos de recolección de datos

2.4.1 Técnica

La técnica utilizada fue, la observación experimental, que consistió en observar los cambios o procesos de como ocurre el fenómeno, posteriormente a ello se registró la información para su posterior análisis.

2.4.2 Procedimiento

2.4.2.1 Obtención y preparación del extracto

Se utilizó un tipo de propóleos natural, procedente del Departamento de Lambayeque (Bosque Seco de Pomac), obtenido por el centro de apicultura “Honey Bee” de la ciudad de Trujillo, con la ayuda de un especialista con experiencia en la recolección de este recurso natural, el cual fue recolectado y transportado en contenedor hermético al laboratorio de la Universidad César Vallejo. En el laboratorio, se eliminó las impurezas con pinzas estériles, se lavó con agua hervida a temperatura ambiental, se dejó secar a temperatura de ambiente y cuando estuvo ya seca se cortó en partículas uniformes. Luego, se pesó 8 g de propóleos, envolviéndolos en papel filtro y colocándolos en el extractor del equipo Soxhlet; mientras que, en el matraz, del mismo equipo, se colocaron 200 mL de etanol al 60%, 70%, 80% y 90%, durante 1 hora y media a una temperatura de 60°. El contenido se filtró varias veces con papel filtro Whatman N° 40, obteniéndose el extracto final.

El extracto de propóleos se colocó en el matraz del rotavapor tipo Buchi y se mantuvo en evaporación hasta la

eliminación del solvente. El sólido obtenido fue sometido a secado en estufa a 70°C durante 2 horas, constituyendo el extracto seco total.

Del extracto seco total, se preparó 4 diluciones de extracto etanólico de propóleos a las concentraciones de 60%, 70%, 80% y 90%, y conservados a 4°C.

2.4.2.2 Cepas bacterianas y halo de inhibición

El presente estudio se realizó en el laboratorio de la Universidad César Vallejo, por la autora, bajo la supervisión del Microbiólogo, donde se utilizaron cepas bacterianas de *Salmonella typhi*, obtenidas del laboratorio de bacteriología de la Universidad Nacional de Trujillo, las cuales fueron conservadas en agar soya tripticasa (TSA) e incubadas, en condiciones aeróbicas, a 37°C durante 24.

Luego se sembró cepas de *Salmonella typhi* en placas Petri de 15cm, donde se hizo la prueba de susceptibilidad usando el método de difusión en disco (Kirby Bauer), donde se prepararon en disco de papel filtro estériles los que fueron sumergidos en cada una de las concentraciones de extracto etanólico de propóleos y después con aguja estéril fueron colocados sobre los cultivos bacterianos. Se utilizó control positivo de ciprofloxacino 500mg y control negativo con agua destilada.

Las placas se incubaron a una temperatura de 37°C durante 24 horas. Finalmente, se midieron los halos de inhibición de crecimiento, e interpretándose las lecturas de acuerdo al Comité Nacional de Estándares de Laboratorio Clínico (NCCLS), que se expresó como sensible (≥ 21 mm), intermedio (17-20 mm) y resistente (≤ 16 mm).

2.4.3 Instrumentos

Ficha de aplicación: Este instrumento fue utilizado para registrar los datos importantes obtenidos en el laboratorio. (Anexo 1)

2.5. Método de análisis de datos

Luego de la aplicación del instrumento, los datos fueron procesados de manera automatizada, en una Laptop Core i3, utilizando los siguientes software: Procesador texto Microsoft Word 2010, Microsoft Excel 2007, Programa Estadístico SPSS 20.

Para el análisis de los datos, se aplicó el análisis de varianza (F de Fisher) para evaluar la diferencia del efecto medio por dilución; la prueba post ANOVA: permitió determinar cuál es la dilución que tiene o que presenta mayor tamaño de halo de inhibición, considerándose la prueba de Tukey.

2.6. Aspectos éticos

Se realizó una solicitud dirigida al comité de Investigación de la Escuela de Medicina de la Universidad César Vallejo para obtener la exoneración de revisión del estudio, debido a que es un estudio *in vitro*, se siguieron las normas éticas de los estudios experimentales desarrollando el proyecto en el laboratorio de la Universidad César Vallejo manteniendo la veracidad de los datos.

III. RESULTADOS

TABLA N°1: Eficacia antimicrobiana del propóleos sobre cepas de *Salmonella typhi*, según el estándar M02 – A11 del NCCLS y M100 - S25.

CONCENTRACIÓN DE PROPÓLEO	RESISTENTE		INTERMEDIO		SENSIBLE	
	N	%	N	%	N	%
90 %	0	0	20	71.4	8	28.6
80 %	16	57.1	8	28.6	4	14.3
70 %	28	100.0	0	0	0	0
60 %	28	100.0	0	0	0	0

Fuente: Datos del Autor, Anexo N° 02

Interpretación: Al evaluar la eficacia antimicrobiana de propóleos sobre cepas de *Salmonella typhi* según el estándar M02 – A11; se observó que a las concentraciones de 60 y 70%, el 100% de cepas bacterianas fueron

resistentes; mientras que, a 80%, el 57.1% de cepas fueron resistentes, 28.6% de cepas tuvieron una eficacia intermedia, y solo el 14.3% de cepas fueron sensibles. La concentración del 90% de propóleos tiene una eficacia intermedia en el 71.4 % de cepas bacterianas y el 24.5 fueron sensibles.

TABLA N° 2: Indicadores estadísticos del tamaño del halo de inhibición del crecimiento de cepas de *Salmonella typhi*, en mm, a distintas concentraciones del extracto etanólico de propóleo y ciprofloxacino.

Concentración de propóleos	Indicadores estadísticos			
	Promedio	Mediana	Desviación estándar	Rango cuartilico
60 %	8.5	9.0	1.3	2.0
70 %	12.4	12.0	1.8	3.0
80 %	17.0	16.0	2.4	3.0
90 %	19.6	19.5	1.5	3.0
Ciprofloxacino	21.9	22.0	1.4	2.8

Fuente: Datos del Autor, Anexo N° 02

Interpretación: Al comparar los indicadores estadísticos del tamaño del halo de inhibición del crecimiento de las cepas de *Salmonella typhi* por la acción de diferentes concentración del extracto etanólico de propóleos, se observa que a medida que aumenta la concentración también aumenta el tamaño promedio y la mediana del halo de inhibición, de 8.5 a 19.6 mm y de 9.0 a 19.5 mm, respectivamente; en tanto que, con ciprofloxacino es de 21.9mm y 22.0 mm, respectivamente.

TABLA N° 03: Prueba de Tukey de los valores de halos de inhibición del crecimiento de las cepas de *Salmonella typhi* para medir la eficacia antimicrobiana de las concentraciones del extracto etanólico de propóleos comparado con ciprofloxacino

CONCENTRACION, %	N	Subconjuntos, $\alpha= 0.05$				
		1	2	3	4	5
60	28	8.5				
70	28		12.4			

80	28	17.0			
90	28	19.6			
CIPROFLOXACINO	28	21.9			
Sig.		1.0	1.0	1.0	1.0

Fuente: Datos del Autor

Interpretación: Los resultados de la Prueba de Tukey expresan la agrupación en 5 subconjuntos según su homogeneidad del efecto (tamaño promedio del halo de inhibición) con $p < 0.05$ en la que se considera que las concentraciones del extracto etanólico de propóleo (60, 70, 80 y 90%) y la del ciprofloxacino tiene distinto efecto (en ninguna de las columnas se ha considerado a 2 o más concentraciones) por lo tanto el ciprofloxacino tiene mayor efectividad seguido de la concentración de 90% respecto al tamaño promedio del halo de inhibición con 21.9 y 19.6 mm, respectivamente.

IV. DISCUSIÓN

La eficacia antimicrobiana de propóleos que fue medida mediante la prueba de difusión en disco *in vitro* sobre las cepas de *Salmonella typhi* refiere que el 100% de cepas bacterianas fueron resistentes a las concentraciones de 60 y 70%; mientras que, el 57.1% de cepas fueron resistentes a 80% de propóleos, 28.6% de cepas tuvieron una eficacia intermedia, y solo el 14.3% de cepas fueron sensibles (Tabla N° 01). Del mismo modo, la concentración del 90% de propóleos tuvo una eficacia intermedia en el 71.4 % de cepas bacterianas y el 24.5 fueron sensibles. Estos hallazgos son comparables con el estudio de Gutiérrez y Suarez⁹, donde se observó inhibición de *Salmonella* sp. con las concentraciones de extracto etanólico utilizadas (etanol al 96%).

En otro estudio realizado por Preeti, et al., (India 2014)⁶, donde se evaluó el potencial terapéutico de propóleos contra los daños causados por *Salmonella*, resultó que la carga bacteriana en el grupo infectado y no sobreviviente fue bastante alta, un 15 a 30% por día, a diferencia del grupo tratado con propóleos en extracto con alcohol 70%, que al final de los 30 días el recuento disminuyó considerablemente ($p < 0.050$).

El tamaño promedio de los halos de inhibición del crecimiento de las cepas de *Salmonella typhi* por la acción de diferentes concentración del extracto etanólico, se observa que a medida que aumenta la concentración también aumenta el halo de inhibición, de 8.5 a 19.6 mm. Hallazgo comparable con Gutiérrez y Suarez⁹, quienes se determinaron la capacidad inhibitoria del extracto etanólico del propóleos sobre *Salmonella*, observando un halo de inhibición a partir de 8.0 mm de diámetro, y además se evidenció actividad bactericida y bacteriostática del extracto etanolico de propóleos a 0.6 mg/mL.

El antibiótico ciprofloxacino usado como Control en el estudio *in vitro* logró alcanzar un halo de inhibición de 21.9 mm de diámetro, valor superior al

obtenido con la concentración al 90% de propóleos que fue de 19.6 mm (Tabla N° 02). Por tanto, de acuerdo a los resultados obtenidos se puede concluir que el ciprofloxacino tuvo mayor efectividad seguido de la concentración de 90%. Un estudio con *Salmonella typhi* determinó que es sensible a los fármacos ciprofloxacino y quinolona cuyo mecanismo de acción se dirige contra la ADN girasa bacteriana y la topoisomerasa IV. De manera similar son bactericidas potentes contra *E. coli*, *Campylobacter* sp. y diversas especies de *Salmonella*, *Shigella*, *Enterobacter* y *Neisseria*, pues se administra vía oral teniendo buena absorción, siendo su concentración sérica máxima alrededor de las tres primeras horas.²³

Así mismo, el tratamiento con ciprofloxacino y ofloxacina permitió erradicar la mayoría de *Salmonella typhi* en los pacientes con diarrea, así como infecciones distintas de la tifoidea en los pacientes con SIDA y elimina el estado de portador fecal crónico. Sin embargo tiene reacciones adversas en el aparato digestivo como náuseas leves, vómito y/o dolor abdominal.²⁴

La Prueba de Tukey permitió demostrar que los valores del tamaño promedio de los halos de inhibición obtenidos en cada ensayo corresponden a cinco subconjuntos diferentes, con $p < 0.05$, en la que se considera que las concentraciones del extracto etanólico de propóleos (60, 70, 80 y 90%) y la del ciprofloxacino tiene distinto efecto (en ninguna de las columnas se ha considerado a 2 o más concentraciones) por lo tanto el ciprofloxacino tiene mayor efectividad seguido de la concentración de 90% respecto al tamaño promedio del halo de inhibición con 21.9 y 19.6 mm, respectivamente (Tabla N° 03).

Los resultados del estudio sugiere que podría establecerse las concentraciones del 80 y 90 % de propóleos como rangos de efectividad del extracto etanólico para los géneros bacterianos que se encuentran en la zona geográfica donde se produce el propóleos. Esta efectividad además puede deberse a los componentes orgánicos del propóleos los cuales son dependientes de las regiones de origen.

Actualmente las enterobacterias tienen una relevante importancia en la salud pública del mundo, siendo una de ellas *Salmonella typhi*, causante de los síndromes diarreicos agudos, por lo que se resalta la eficacia antibacteriana del propóleos ante este agente patógeno, pues se puede usar como tratamiento alternativo. Es por ello importante este estudio porque permitió demostrar que el extracto etanólico de propóleo es una nueva alternativa en el tratamiento de los procesos infecciosos ocasionados por esta bacteria, con la ventaja de ser un producto natural al cual no hay resistencia y cuyo único efecto adverso reportado son las reacciones alérgicas.

V. CONCLUSIONES

1. El extracto etanólico de propóleo no tiene eficacia antimicrobiana in vitro sobre cepas de *Salmonella typhi*.
2. La concentración de 90% de propóleos no superó la efectividad del ciprofloxacino sobre cepas de *Salmonella typhi*.

VI. RECOMENDACIONES

1. Evaluar la eficacia antimicrobiana de otros propóleos de diferente región sobre la viabilidad de cepas de *Salmonella typhi*.
2. Repetir esta experiencia con propóleos sobre otras bacterias patógenas para el ser humano.
3. Determinar la eficacia antimicrobiana del propóleos sobre hongos y levaduras patógenas de ser humano.
4. Evaluar otros factores en el ensayo, por ejemplo la concentración del alcohol para preparar las diferentes concentraciones.

VII. REFERENCIAS

1. Adelantado F. C. La Salmonella, de actualidad desde siempre. Publisher Real Escuela de Avicultura. Cap. 1 pag.9.
2. Asociación de Médicos de Sanidad Exterior (AMSE). Fiebre tifoidea: Epidemiología y situación mundial. [Internet]. España; 2012. [Citado el 17 de julio del 2015]. Disponible en:
http://www.amse.es/index.php?option=com_content&view=article&id=87:fiembre-tifoidea-epidemiologia-y-situacion-mundial&catid=42:inf-epidemiologica&Itemid=50
3. Novoa J, Chávez R, Díaz C, Fernández J. Boletín epidemiológico EsSalud: Gerencia de Red asistencial Lambayeque. [Internet]. Perú; 2014. [Citado el 17 de Julio del 2015]. Disponible en:
<http://es.slideshare.net/cristiandiazv/boletn-epidemiologico-ene2014>
4. Gómez-Caravaca AM, Gómez-Romero M, Arraéz-Román D, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A. Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. [Internet] España; 2006. [Citado el 17 de Julio del 2015]. Disponible en:
<http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.379.6033&rep=rep1&type=pdf>
5. Palomino L, Martínez J, García C, Gil J, Durango D. Caracterización fisicoquímica y actividad antimicrobiana del propóleo en el municipio de La Unión (Antioquia, Colombia). [Internet] Colombia; 2010. [Citado el 17 de Julio del 2015]. Disponible en:
<http://www.redalyc.org/pdf/1799/179914617015.pdf>
6. Preeti K, Neelima R, Kusum H. The therapeutic potential of propolis against damage caused by *Salmonella thyphimurium* in mice liver: a biomechemical and histological study. [Internet] Serbia; 2014. [Citado el 18 de Julio del 2015]. Disponible en: <http://www.doiserbia.nb.rs/img/doi/0354-4664/2015%20OnLine-First/0354-46641500040K.pdf>
7. Suárez H, Jiménez A, Díaz C. Determination of microbiological and sensory parameters of fish fillets with propolis preserved under refrigeration. [Internet]. 2013; 19(3):4214-4225 [Citado el 18 de Julio del 2015].

Disponible en: <http://revistas.unicordoba.edu.co/revistamvz/mvz-193/v19n3a03.pdf>

8. Aygun A, Sert D, Copur G. Effects of propolis on eggshell microbial activity, hatchability, and chick performance in *Japanese quail (Coturnix coturnix japonica)* eggs. [Internet]. Poultry Science: Turkia; 2012. [Citado el 18 de Julio del 2015]. Disponible en:
<https://ps.oxfordjournals.org/content/92/12/3330.full.pdf+html>
9. Gutierrez C, Suarez H. Efecto conservante de propóleos en Chorizos. [Internet] 2012 Abril. [Citado el 18 de Julio del 2015]. Disponible en:
<http://www.redalyc.org/pdf/1698/169823914044.pdf>
10. Gil M, Perelli A, Alvarado R, Arias Y, Blumenthal E. Actividad bacteriostática y bactericida de la tintura de propóleos sobre bacterias enteropatógenas, *Salus* [Internet] [Citado el 18 de Julio del 2015]. 2012; 16 (3): 021-025. Disponible en: <http://www.scielo.org.ve/pdf/s/v16n3/art06.pdf>
11. Carrillo M, Castillo L, Mauricio R. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos de la Huasteca Potosina. [Tesis en internet]. México; 2011. [Citado el 18 de Julio del 2015]. Disponible en:
<http://www.scielo.cl/pdf/infotec/v22n5/art04.pdf>
12. Murray P, Rosenthal K, Paller M. Microbiología médica. Sexta ed. España: Elsevier; 2009. 308 p.
13. Jiménez J R, Arenas M C, Doblaz D A, Rivero A, Torre-Cisneros J. Fiebre tifoidea y otras infecciones por salmonellas. *Medicina* [Internet] [Citado el 19 de Julio del 2015]. 2010; 10 (52): 3497-501. Disponible en:
http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/pdf/Tifoidea_otras_salmonellas_Medicine20100.pdf
14. Chaillou LL. Estudio del Propóleos de Santiago del Estero. [Internet] [Citado el 19 de Julio del 2015]. 2004; 24(1): 011-015. Disponible en:
<http://www.scielo.br/pdf/cta/v24n1/20033.pdf>
15. Lund Arne. La curación con la miel. Barcelona: RobinBook; 1999. 77 p.
16. McMarcucci M. Propolis: Chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*, Springer Verlag. [Internet]. 1995; 26: 83-89. [Citado el 18 de Julio del 2015]. Disponible en: <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00891249/document>

17. Brushi M L, Franco S L, Gremiao M P. Application of an HPLC method for analysis of propolis extract. [Internet] 2003 [Citado el 18 de Julio del 2015]; 26(14): 2399-2409 .Disponible en: http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1081/JLC-120023254#.VcWWkvl_Oko
18. Eguizábal M. Actividad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de propóleo peruano sobre *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus casei*. [Tesis en internet]. Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2007. [Citado el 18 de Julio del 2015]. Disponible en: http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/odontologia/2007_n2/pdf/a06.pdf
19. Lacalle A. Propóleo, el “antibiótico” natural de la colmena. Revista agropesquera, [Internet] Gobierno Vasco; 2008. [Citado el 20 de Julio del 2015]; (85):56-61. Disponible en: http://www.euskadi.eus/contenidos/boletin_revista/sustrai_85/es_agripes/adjuntos/85_56-61_c.pdf
20. López J, Ubillús M. Estandarización del propóleo de la provincia de Oxapampa, Departamento de Pasco (Perú) como materia prima para su utilización a nivel industrial. [Tesis en internet] Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2004. [Citado el 20 de Julio del 2015]. Disponible en: http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/2328/1/Lopez_vj.pdf
21. König B. Plant sources of propolis. [Internet] 1985. [Citado el 20 de Julio del 2015]; 66(136): 136-139. Disponible en: http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/0005772X.1985.11098844?journalCode=tbee20#.VcWcTfl_Oko
22. Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernández-López J. y Pérez-Álvarez JA. Functional Properties of Honey, Propolis and Royal Jelly. [Internet] 2008. [Citado el 20 de Julio del 2015]. Disponible en: https://havlikovaapoteka.cz/documents/study_functional_properties_of_honey_propolis_and_royal_jelly.pdf
23. Vacarezza M. Quinolonas. [Internet] 2004. [citado el 20 de Julio del 2015]. Disponible en: <http://www.infecto.edu.uy/terapeutica/atbfa/quino/quinolonas.htm>.

24. Brunton L. Goodman y Gilman: Las bases farmacológicas de la terapéutica.
12^{va} ed. España: McGrawHill; 2010. 1470 p.

ANEXO N° 01

Ficha de recolección de datos

**Eficacia antibacteriana del extracto etanólico del propóleo sobre cepas de
Salmonella typhi: Estudio *in vitro***

I.-Datos Generales

Fecha

II.-DATOS DE LA VARIABLE DEPENDIENTE:	Eficacia antimicrobiana sobre cepas de <i>Salmonella typhi</i> a) Prueba de difusión en disco
--	---

III.-DATOS DE LA VARIABLE INDEPENDIENTE	Concentración del extracto etanólico de Propóleo: a) Extracto etanólico de propóleos.
--	--

Nº de repeticiones	Diluciones					
	90%	80%	70%	60%	Control Positivo	Control Negativo
1						
2						
3						
4						
5						
...						
28						
Promedio						

ANEXO N° 02

Hoja de recolección de datos

TABLA N° 04. Diámetros de halo de inhibición del crecimiento de cepas de *Salmonella typhi* sometidos a las diferentes concentraciones de extracto etanólico del propóleo y controles.

Diámetro de halo de inhibición de crecimiento, mm						
Código	Concentraciones de propóleos, %				Control	
	90	80	70	60	Positivo	Negativo
1	23	20	13	9	23	0
2	21	18	12	7	23	0
3	18	15	12	9	21	0
4	18	16	13	11	22	0
5	18	15	14	9	20	0
6	20	15	15	9	22	0
7	22	16	12	10	22	0
8	21	15	12	9	20	0
9	21	22	16	10	23	0
10	18	21	14	10	23	0
11	20	21	15	11	24	0
12	18	21	16	10	23	0
13	21	16	11	8	24	0
14	19	15	12	7	23	0
15	19	18	14	9	20	0
16	20	18	12	9	23	0
17	18	16	11	7	24	0
18	19	16	11	9	23	0
19	18	15	10	9	20	0
20	22	17	11	9	21	0
21	20	14	10	7	21	0
22	19	16	12	8	20	0
23	17	15	11	6	23	0
24	19	14	10	7	21	0
25	22	20	15	7	20	0
26	19	18	12	7	22	0
27	20	18	10	9	21	0
28	20	14	11	7	20	0
Promedio	19.6	17.0	12.4	8.5	21.9	0