



FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS

ESCUELA ACADÉMICA PROFESIONAL DE MEDICINA

“Eficacia antibacteriana del extracto de *Propolis* de *Apis mellífera* “Propóleo”
sobre *Pseudomonas aeruginosa*, estudio in vitro”

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE MEDICO
CIRUJANO

AUTOR:

CRUZADO JUAREZ, ANA ROSA

ASESOR:

MG. JAIME ABELARDO POLO GAMBOA

DR. SANTIAGO MOISES BENITES CASTILLO

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:

MEDICINA ALTERNATIVA

TRUJILLO – PERÚ

2016

PÁGINA DEL JURADO

Eficacia antibacteriana del extracto de *Propolis de Apis mellifera* "Propóleo" sobre *Pseudomonas aeruginosa*, estudio in vitro

Dr. Luis Alberto Arana Amaya

PRESIDENTE DEL JURADO

Dr. Santiago Moisés Benites Catillo

SECRETARIA DEL JURADO

Mg. Jaime Abelardo Polo Gamboa

VOCAL DEL JURADO

FECHA DE SUSTENTACIÓN Y APROBACIÓN.

8 de diciembre del 2016

DEDICATORIA

A mis padres: Moisés y Virginia por su ejemplo, comprensión y apoyo incondicional para mi vida personal y para la realización como profesional.

Ana Rosa Cruzado Juárez

AGRADECIMIENTO

A Dios que me acompaña, ilumina, protege y guía en mi vida. Por fortalecerme cada día con sus promesas y mostrarme el camino.

A mi asesor por su incondicional asesoramiento y por dedicar tiempo exclusivo para resolver mis interrogantes del trabajo de investigación,

Ana Rosa Cruzado Juárez

DECLARATORIA DE AUTENTICIDAD

Yo, Ana Rosa Cruzado Juárez con DNI N° 72485492 a efecto de cumplir con las disposiciones vigentes consideradas en el Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad César Vallejo, Facultad de Ciencias Médicas, Escuela de Medicina, declaro bajo juramento que toda la documentación que acompaño es veraz y auténtica.

Así mismo, declaro también bajo juramento que todos los datos e información que se presenta en la presente tesis son auténticos y veraces.

En tal sentido asumo la responsabilidad que corresponda ante cualquier falsedad, ocultamiento u omisión tanto de los documentos como de información aportada por lo cual me someto a lo dispuesto en las normas académicas de la Universidad César Vallejo.

Trujillo, 8 de diciembre del 2016

Cruzado Juárez Ana Rosa

PRESENTACIÓN

Señores miembros del Jurado:

En cumplimiento del Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad César Vallejo presento ante ustedes la Tesis titulada: “Eficacia antibacteriana del extracto de *Propolis de Apis mellifera* “Propóleo” sobre *Pseudomonas aeruginosa*, estudio in vitro”, la misma que someto a vuestra consideración y espero que cumpla con los requisitos de aprobación para obtener el título Profesional de Médico Cirujano.

Ana Rosa Cruzado Juárez

PÁGINA DEL JURADO.....	ii
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTO.....	iv
DECLARATORIA DE AUTENTICIDAD.....	v
PRESENTACIÓN	vi
ÍNDICE.....	vii
RESUMEN.....	viii
ABSTRACT.....	ix
I. INTRODUCCIÓN.....	10
1.1. PROBLEMA	17
1.2. HIPÓTESIS.....	17
1.3. OBJETIVOS.....	17
II. METODOLOGÍA.....	18
2.1. IDENTIFICACIÓN DE VARIABLES	18
2.2. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES.....	19
2.3. TIPO DE ESTUDIO.....	20
2.4. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN	20
2.5. POBLACIÓN, MUESTRA Y MUESTREO	21
2.6. CRITERIOS DE SELECCIÓN:.....	21
2.7. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS	21
2.8. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE DATOS.....	23
2.9. ASPECTOS ÉTICOS.....	23
III. RESULTADOS	25
IV. DISCUSIÓN.....	30
V. CONCLUSIONES.....	32
VI. RECOMENDACIONES	32
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:	33
ANEXOS	37

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue comparar el efecto del Propóleo a diferentes concentraciones sobre *Pseudomonas aeruginosa* con el efecto de amikacina, por lo que en estudios anteriores como el de Alayo G (Perú, 2014) se evaluó el efecto antibacteriano del propóleo contra la *Pseudomonas aeruginosa*, encontrando que esta no es sensible al propóleo con promedio de halo <8 mm según la escala de Duraffourd y no hubo CMI.

En este estudio se preparó el extracto etanólico de Propóleo al 25%, 50%, 75% y 100%. Así mismo se procedió a preparar los discos con Propóleo mediante el método de Kirby y Bauer y se comparó con la amikacina 30 mcg, frente a las cepas de *P. aeruginosa* que fueron cultivadas en Mueller Hinton para luego sembrarlas en cada placa; se realizaron 21 repeticiones de cada caso.

Los resultados indicaron que el extracto de Propóleo a diferentes concentraciones no presenta efecto inhibitorio sobre *Pseudomonas aeruginosa*, pero sí la hay frente a amikacina, encontrando una diferencia significativa.

Por lo que se concluye que el propóleo no presenta eficacia antibacteriana *contra Pseudomonas aeruginosa* a ninguna concentración.

Palabras clave: extracto de Propóleo, *Pseudomonas aeruginosa*.

ABSTRACT

The objective of this study was to compare the effect of Propolis at different concentrations on *Pseudomonas aeruginosa* with the effect of amikacin, so that previous studies such as Alayo G (Peru, 2014) evaluated the antibacterial effect of propolis against *Pseudomonas aeruginosa*, Finding that it is not sensitive to propolis with average halo <8 mm according to the Duraffourd scale and there was no IMC.

In this study, 25%, 50%, 75% and 100% ethanolic extract of Propolis was prepared. Also the discs were prepared with Propolis by the method of Kirby and Bauer and was compared with the amikacina 30 mcg, against the strains of *P. aeruginosa* that were cultivated in Mueller Hinton soon to be planted in each plate; 21 replicates of each case were performed.

The results indicated that the Propolis extract at different concentrations does not present an inhibitory effect on *Pseudomona aeruginosa*, but there is an inhibitory effect against amikacin, finding a significant difference.

Therefore, it is concluded that propolis has no antibacterial efficacy against *Pseudomona aeruginosa* at any concentration.

Key words: Propolis extract, *Pseudomonas aeruginosa*.

I. INTRODUCCIÓN

Desde tiempos muy antiguos se ha usado la medicina tradicional basándose en los conocimientos, prácticas, creencias y experiencias indígenas de distintas culturas. Se han utilizado para el mantenimiento, prevención de la salud, diagnóstico, mejora o el tratamiento de enfermedades físicas o mentales.¹

Así también, en el mundo, la medicina complementaria o alternativa cada vez se difunde más. Cabe señalar como ejemplo a Estados Unidos, donde un tercio de los encuestados (425 millones) manifestó que había utilizado al menos en una oportunidad la medicina alternativa en un período de 12 meses. En salud este tema no es indiferente por ello es imperativo su estudio y análisis. Pero debemos diferenciar la charlatanería con la genuina medicina tradicional y alternativa.³

Así mismo, se muestra que en otros países desarrollados también se utiliza en gran porcentaje las terapias alternativas. Informes muestran que un 46% de los australianos, 49% de franceses y 70% de canadienses han utilizado alguna de esas terapias. Y aproximadamente por año gastan los estadounidenses 13 700 millones de dólares en medicina alternativa, incrementando su uso en países en vías de desarrollo.³

Sudamérica no es la excepción, puesto que en Perú se ve un escenario parecido, un gran porcentaje de la población consume medicina tradicional. Un estudio realizado en un hospital de Lima de cuarto nivel encontró que cerca de 70% de pacientes utilizó alguna medicina tradicional.³

En el Perú existen dos organismos de salud, uno es MINSA (Ministerio de Salud) que es estatal, y EsSalud (Seguro Social de Salud) que es privado. En EsSalud existen programas completos de medicina alternativa y se observa que cerca de 400 mil pacientes asegurados utilizan diversos tratamientos con medicina complementaria con mejora de su calidad de vida.⁴ En el año 2011 en EsSalud se atendió a 55 371 pacientes entre los 25 a 79 años de edad obteniendo que un 71% fue de sexo femenino y utilizaron productos naturales en algún momento del año. La procedencia de pacientes fue principalmente de la consulta externa y las terapias mayormente utilizadas fueron acupuntura, fitoterapia y frototerapia.⁵

De la revisión de trabajos de investigación respecto al problema de investigación se encontró:

Alayo G ⁶ (Perú, 2014) en su trabajo con título “Efecto in vitro del Propóleo sobre *Pseudomona aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* comparando con sulfadiazina de plata”, evaluó el efecto bactericida mediante la técnica de Kirby y Bauer y determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM), para lo cual se utilizaron 13 repeticiones de 4 diluciones del extracto etanólico de propóleo a 5% (50 mg/ml), 25% (250 mg/ml), 50% (500 mg/ml) y 75% (750 mg/ml) siendo comparado con sulfadiazina de plata y el inóculo de *S. aureus* y a *P. aeruginosa*. Encontraron que la *P. aeruginosa* no es sensible al Propóleo, con promedio de halo <8 mm según la escala de Duraffourd y no hubo CMI; sin embargo, si fue sensible al *S. aureus* en las 4 concentraciones de Propóleo. Además se encontró para los grupos de tratamiento para *P. aeruginosa*, diferencia significativa ($p < 0.05$). Concluyendo que dicho extracto no tiene efecto inhibitorio para *P. aeruginosa* pero sí para *S. aureus*, incluso mostró semejanza con la sulfadiazina de plata.

Tolosa L. et al ⁷ (México, 2002) en su estudio “Obtención, caracterización y evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos de Campeche” evaluaron la actividad antimicrobiana e identificación de metabolitos en los extractos de propóleo: etanólico y acuoso, con 10 muestras de las localidades del estado de Campeche, sobre *S. aureus*, *Sallmonella typhi*, *P. aeruginosa* y *S. Pyogenes*, donde refirieron encontrar que los extractos etanólicos son más efectivos que los acuosos, y en cuanto a la actividad antimicrobiana mediante el método de Concentración Mínima bactericida se encontró que la bacteria más resistente fue *S. typhi* seguidas de *S. aureus* y *S. pyogenes*, se encontró que la más sensible fue la *P. aeruginosa* encontrando un nivel de confianza del 99%. Los metabolitos presentes en ambos extractos son lactonas, saponinas, fenoles y taninos, flavonoides, triterpenos, esteroides, alcaloides y en menor proporción los grupos aminos, donde la actividad antimicrobiana es por los flavonoides y fenoles, además depende del disolvente utilizado, la procedencia y la cepa.

García M. et al ⁸ (Cuba, 2007) en el estudio “Actividad in vitro del Propóleos frente a patógenos bacterianos aislados de infecciones humanas”, evaluaron la efectividad antimicrobiana de dos extractos etanólicos al 70%. Se determinó la Concentración Inhibitoria Mínima (CMI) mediante el método de dilución en agar con 30 cepas de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa* obtenidas del laboratorio de microbiología de Santa Clara. Se determinó la CMI mediante diferentes concentraciones. Se encontró que las cepas de

Staphylococcus aureus y *S. epidermidis* fueron sensibles a muy bajas concentraciones de propóleos, pero *P. aeruginosa* fue inhibida a grandes concentraciones de Propóleo obteniendo una CMI de 8 – 10,5 µg/mL. Concluyeron que el extracto de propóleo podría ser usado en heridas, quemaduras y úlceras gástricas.

Bispo W, et al ⁹ (Brasil, 2012) en el estudio “Actividad antimicrobiana de las fracciones de propóleos rojos de Alagoas, Brasil”, evaluaron la actividad antimicrobiana del extracto etanol y hexano, cloroformo y las fracciones acetanólica de propóleos de apiario. Se evaluaron cepas como *Shigella flexneri*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*, demostrando la actividad antimicrobiana mediante la Concentración Mínima Inhibitoria contra las cepas gram positivas (100%), gram negativas (62,5%) y hongos (100%), demostrando así la resistencia a la actividad antimicrobiana del Propóleo para *Pseudomonas aeruginosa* y a otras cepas en determinados extractos.

Samara N. et al ¹⁰ (Colombia, 2011) en el siguiente estudio “Actividad antibacteriana y composición cualitativa de propóleos provenientes de dos zonas climáticas del departamento del Cauca” evaluaron la actividad bactericida y análisis químico en dos muestras de Buenos Aires y de Totoró. Se evaluó la actividad antibacteriana mediante el método de dilución en caldo y el análisis químico mediante pruebas de reacciones coloridas entre otros. Las cepas utilizadas fueron el *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* teniendo 10 repeticiones cada una. La Concentración Mínima Bactericida (CMB) para *P. aeruginosa* fue 17.03 mg/mL y 30.78 mg/dL el de Buenos Aires y el de Totoró respectivamente. Además se utilizó mayor concentración de Propóleo proveniente de Totoró para inhibir la bacteria arrojando diferencias significativas ($p < 0.05$) y demostrado que fue más efectivo el Propóleo de Buenos Aires que el de Totoró.

Gebara E, et al ¹¹ (Brasil, 2002) en el estudio “Actividad antimicrobiana del Propóleo frente a bacterias periodontopáticas”, evaluaron la eficacia antibacteriana del propóleo en diferentes concentraciones contra cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* cultivadas en el laboratorio con 4 muestras de repetición. Se utilizó medios de cultivo como agar de infusión de cerebro y corazón. La MIC para *P. aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* (de tipo salvaje) fue 14 ml, concluyendo que el uso de Propóleo puede ser adicional a una terapia convencional.

Velázquez C, et al ¹² (México, 2007) determinaron la actividad antimicrobiana del extracto de propóleo obtenidas en tres provincias del estado de Sonora. Se evaluó la eficacia con bacterias gram

negativas y positivas. Encontrándose una fuerte actividad antibacteriana contra *S. aureus*. Así mismo, se demostró que no posee ninguna actividad contra bacterias gram *negativas E. coli* y *P. aeruginosa* coincidiendo con sus revisiones anteriores. Se determinó mediante el método de microdilución de caldo y se comparó con gentamicina de 12 lg/ml encontrándose diferencias significativas a partir de cultivos celulares.

En relación a los aspectos teóricos que sustentan la presente investigación se encontró que: Propóleo, genitivo de propolis, del vocablo griego que significa <<puerta de una ciudad>>, es una sustancia oscura y pegajosa de consistencia resinosa con que las abejas protegen su colmena aislándolo del exterior con condiciones impermeables, sin que puedan entrar posibles pequeños intrusos o agentes infecciosos.¹³

Ya en la edad antigua se hacía mención del poder antibacteriano del Propóleo, tal es el ejemplo de Aristóteles quien lo mencionaba como un buen remedio para infecciones en la piel, llagas y supuraciones. Además, Galeno, en el siglo II y Avicena en el XI, insisten en su potencial terapéutico y durante la Edad Media se usó profusamente en Europa para el tratamiento de las úlceras y llagas, pero desde principios del siglo XX, y con motivo de la guerra de los borres, en África del Sur, es cuando se popularizó a gran escala su gran poder cicatrizante en el tratamiento de las heridas infectadas.¹⁴

El propóleo es la sustancia viscosa elaborada por insectos pertenecientes a la familia Apidae, especie *Apis mellifera* a partir de sus secreciones y savia de distintos árboles, especialmente coníferas. Esto le da la propiedad de variar de acuerdo a la vegetación encontrada en cada zona. Las abejas lo emplean como material de construcción para minimizar el acceso aislándolo del exterior, y antiséptico. Contiene un 50% de resinas (compuestos flavonoides, 10% de aceites esenciales, ácidos orgánicos, esteroides y aldehídos fenólicos), 30% de ceras, 5% de polen y 5% de otros compuestos orgánicos. Entre los compuestos resinosos destacan los siguientes flavonoides: galangina, quercetina, canferol, apigenina, entre otros; así como los ácidos fenólicos: cumárico, cafeico y cimámico.¹⁹ Además, contiene muchos nutrientes como: proteínas, aminoácidos, minerales, vitaminas A, E y C, y complejo B.¹⁷

Se ha demostrado que la actividad antibacteriana está dada principalmente por el compuesto de hidroxiflavona que proporciona excelentes resultados frente a infecciones producidas por bacterias

grampositivas.^{16,20 y 21} Entre otros compuestos tenemos a los ácidos benzoicos, oxibenzoico, cafeico, y/o ferúlico.^{10, 13-14}

El Propóleo por sus múltiples propiedades, en el comercio se ofrece varias presentaciones como crema, jabón, bronceador, loción tónico, shampoo, caramelos y/o gotas, etc. Externamente se puede utilizar en afecciones de la piel: acné, eczemas, hongos, quemaduras leves, manchas de la piel, aftas, forúnculos, heridas superficiales, en cosmética, etc.¹⁹ Actúa como antibacteriano, antiinflamatorio y analgésico en caso de faringitis, laringitis, aftas bucales y abscesos dentales.¹⁵

Se debe tener en cuenta que el uso de propóleo puede desencadenar efectos secundarios en personas alérgicas a las picaduras de las abejas y a los productos fabricados por estos insectos (polen, miel, jalea real, etc.). También su uso está contraindicado en pacientes con asma bronquial ya que podría empeorar los síntomas. Hay personas sensibles al Propóleo (una de cada dos mil), y pueden presentar hinchazón rojiza en la piel cuando lo tocan. Tener en cuenta que el propóleo puede provocar náuseas y vómitos si se toma junto a metronidazol o disulfiram.¹³

La medicina tradicional hace un siglo ha reconocido sus propiedades terapéuticas, y en los años 60 se profundizó en su estudio científico, añadiendo a su verificada propiedad antimicrobiana sus efectos cicatrizantes, antiinflamatorios, antioxidantes, inmunoestimulantes y citotóxicos.²⁰

Se estipula que el propóleo desencadena la fagocitosis, mecanismo por medio del cual los glóbulos blancos de la sangre destruyen las bacterias. El propóleo se puede consumir como suplemento alimenticio para eliminar infecciones bacterianas. Se puede utilizar como ungüento para las excoriaciones y las contusiones. Además disminuyen la inflamación de las mucosas de la boca y garganta. Sirve para la tos, la amigdalitis, las úlceras y el acné.^{21, 22}

Una de las bacterias comunes en nuestro medio es *Pseudomonas aeruginosa*, que es un patógeno oportunista de plantas, animales y del ser humano. Comúnmente se encuentra en la tierra, materia descompuesta, hospitales y en ambientes húmedos. Sus necesidades de crecimiento son mínimas por lo que se reproducen rápidamente.

Las *Pseudomonas* son bacilos gramnegativos móviles, rectos y ligeramente curvos (0.5 a 1 x 1.5 a 5 µm) con distribución en par. Poseen la característica que no son fermentadores y realizan metabolismo respiratorio mediante hidratos de carbono. Son aerobios estrictos, pero también se reproducen de forma anaerobia. Una manera de diferenciarlas de las enterobacterias es la presencia de citocromo oxidasa (mediante prueba rápida).²³

El género *Pseudomonas* está compuesto más o menos 10 especies, pero *Pseudomonas aeruginosa* es la más frecuente en la forma clínica. *Pseudomonas aeruginosa* posee múltiples factores de virulencia como componentes de su estructura, toxinas y enzimas. Entre ellos las adhesinas; capsula de polisacáridos o glucocálix protegiéndola de fagocitosis y de los antibióticos; piocianina ocasiona daño tisular; exotoxina A altera la síntesis celular y acción inmunodepresora; fosfolipasa C y, ramnolipido. Además *Pseudomonas* es una bacteria que tiene múltiple resistencia antibiótica, siendo el principal mecanismo de resistencia la mutación de las porinas. ²³

Pseudomonas son patógenos oportunistas presentes en casi cualquier ambiente. Tienen la característica de requerimientos nutricionales mínimos y pueden tolerar temperaturas de 4 a 42° C, siendo también resistentes a varios antibióticos y desinfectantes. ²³

Posee una serie de manifestaciones clínicas: las infecciones respiratorias inferiores, generalmente, en inmunodeprimidos, pueden ser desde una colonización asintomática o llegar hasta bronconeumonía necrosante grave; infecciones cutáneo primarias producto de quemaduras; infecciones oportunistas en pacientes con sonda urinarias permanentes y tratamiento antibiótico de amplio espectro; desde una irritación leve del oído externo hasta destrucción de los huesos craneanos adyacente; infecciones oportunistas. ²³

Pseudomonas crece en medios de cultivo comunes como agar sangre y agar MacConkey pues sus requerimientos nutricionales son pocos. ²³

Las infecciones pueden ser nosocomiales y adquiridas en la comunidad. En pacientes con procedimientos invasivos, sépticos, quemados, neumonías, etc., *Pseudomonas aeruginosa* produce compuestos que estimulan la inhibición de la fagocitosis mediante los macrófagos y los destruye. Esta bacteria posee gran resistencia a los antibióticos y antisépticos, con vida libre y la capacidad de sobrevivir en amplios nichos ecológicos. Debido a esto, el tratamiento para esta cepa está restringido a unos pocos antimicrobianos como amikacina, gentamicina, tobramicina; y otros como cefotaxima, ceftazidima, cefepime, piperaciclina, imipenem. ²³

Los aminoglucósidos poseen un núcleo de hexosa unido por enlaces glucosídicos a dos o más aminoazúcares. La amikacina es un derivado semisintético a partir de knamicina A por acilación del grupo 1-amino. Los aminoglucósidos poseen actividad bactericida rápida y depende de la concentración la rapidez con la que destruirá el patógeno. Además posee un efecto post antibiótico lo que explicaría el uso de una sola dosis al día. ²⁴

Los aminoglucósidos difunden por porinas (canales acuosos) y proteínas en la membrana externa de las bacterias Gram negativas y es por ahí donde penetran al espacio periplasmático; una vez adentro, el transporte depende de electrones, se ligan a polisomas e interrumpen la síntesis proteica al causar una lectura errónea y hacen que se termine prematuramente la traducción de mRNA; produce además fuga de iones, moléculas y proteínas de la bacteria produciendo el efecto de los aminoglucósidos. El sitio específico de acción es la subunidad ribosómica 30S comprendida en 21 proteínas y una sola molécula de RNA de 16S. A pesar de ello, existe resistencia a los aminoglucósidos porque el antibiótico no penetra al interior de la bacteria debido a la escasa afinidad del compuesto por el ribosoma bacteriano o porque la bacteria es inactiva al antibiótico.²⁴

La amikacina ofrece ventaja terapéutica contra bacterias resistentes a gentamicina. Tiene rápida absorción mediante vía intramuscular; se pueden encontrar concentraciones máximas hasta después de 30 a 90 min. Se elimina exclusivamente por filtración glomerular alcanzando concentraciones de 50 a 200 µg/mL en la orina, y en menor porcentaje por vía hepática y biliar. Por lo que se debe tener en cuenta las debidas modificaciones en pacientes con insuficiencia renal y/o hepática. Los tratamientos prolongados pueden ocasionar neurotoxicidad en el nervio acústico, en cambio la nefrotoxicidad es variable y poco frecuente; esto debido a que se encuentran niveles altos de concentración en la corteza renal y en la endolinfa del oído interno.²⁴

Las definiciones conceptuales consideradas en la investigación fueron:

EFICACIA: Capacidad para obtener un efecto deseado o esperado.²⁵

EXTRACTO ETANÓLICO: Extracto que se logra a partir de materia prima desecada de origen vegetal, por maceración en contacto con etanol, posteriormente se elimina dicho solvente.²⁶

HALO DE INHIBICIÓN: Se contabiliza el diámetro de una zona con ausencia de crecimiento bacteriano en una placa de agar inoculada previamente con el germen.²⁹

ANTIBACTERIANO: Sustancia encargada de eliminar bacterias o inhibir su crecimiento o reproducción.²⁶

De lo antes dicho se evidencia que la infección por *Pseudomonas aeruginosa* es poco frecuente en enfermedades humanas, predominando en pacientes nosocomiales. Influye en el favorecimiento de la reproducción, la virulencia del agente y que exista un ambiente adecuado para su crecimiento

como son los sitios húmedos. Es más probable que dichas infecciones se den en personas más vulnerables (inmunodeprimidas) con presencia de métodos invasivos.

Por tal motivo, con el presente estudio se pretende demostrar que existen productos alternativos o complementarios los cuales ayudan a disminuir los efectos secundarios de los tratamientos convencionales, brindando mayor beneficios generando menos gastos y mayor investigación sobre estos productos, como lo es el Propóleo. Por lo tanto, el estudio tendrá relevancia social y científica, ya que influirán más investigaciones sobre su efecto antibacteriano.

El Propóleo es un antibacteriano poco eficaz ante *Pseudomonas aeruginosa*, siendo demostrado en los antecedentes. Pero a pesar de ello, la eficacia antibacteriana del Propóleo depende de la localización obteniéndose variaciones en la flora de la región donde es producido (componentes), la recolección de la materia, la virulencia del agente y la concentración del Propóleo. Además de ello se encontraron algunas limitaciones como fue la obtención del Propóleo y su variabilidad en composición. Actualmente existen en muchos países estudios sobre el extracto de Propóleo, el cual según investigadores, posee propiedades antiinflamatorias, antimicrobianas, antimicóticas y regenerativas.

1.1. PROBLEMA

¿En qué medida el *Propolis de Apis mellifera* "Propóleo" es eficaz como antibacteriano sobre cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, estudio *in vitro*?

1.2. HIPÓTESIS

H₁: El Propolis de *Apis mellifera* (propóleo) es eficaz como antibacteriano en cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.

H₀: El Propolis de *Apis mellifera* (propóleo) no es eficaz como antibacteriano en cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. General

Evaluar la eficacia del Propolis de *Apis mellifera* "propóleo" como antibacteriana sobre

cepas de *Pseudomonas aeruginosa* estudio in vitro.

1.3.2. Específicos:

- Establecer la eficacia antibacteriana del extracto de Propolis de *Apis mellifera* a diferentes concentraciones sobre las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.
- Establecer la eficacia antibacteriana de la amikacina sobre las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*.
- Comparar la eficacia antibacteriana del Propolis de *Apis mellifera* a diferentes concentraciones y la amikacina sobre la cepa de *Pseudomonas aeruginosa*.

II. METODOLOGÍA

2.1. IDENTIFICACIÓN DE VARIABLES

Variable independiente: Tratamiento antibacteriano para *Pseudomonas aeruginosa* (variable cualitativa).

- a) Tratamiento con Propolis de *Apis mellifera*.
- b) Tratamiento con amikacina.

Variable dependiente: Eficacia antibacteriana (variable cualitativa).

2.2. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	INDICADORES	ESCALA DE MEDICIÓN
VI: Tratamiento para <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	En el tratamiento de la bacteria existe el tratamiento farmacológico y no farmacológico.	En el presente estudio se divide las cepas en 5 grupos en relación a las diluciones realizadas con Propóleo de <i>Apis mellífera</i> a) 100% b) 75% c) 50% d) 25%. e) Tratamiento estándar: Amikacina	G1 G2 G3 G4 G5	Cualitativo nominal
VD: Eficacia antibacteriana de <i>Propolis de Apis mellífera</i> .	Capacidad de lograr el efecto que se desea o se espera mediante inhibición del crecimiento antibacteriano por el método de Kirby Bauer.	Según el estándar M100-S24 del CLSI. Los criterios de eficacia ²⁷ : -Sensible: ≥ 17 mm -Indiferente: 15-16 mm -Resistente: ≤ 14 mm	Eficaz (≥ 17 mm) No eficaz (< 17 mm)	Cualitativa nominal

2.3. TIPO DE ESTUDIO

El presente trabajo será de tipo básico.

2.4. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

EXPERIMENTO: TIPO ESTIMULO CRECIENTE CON 5 GRUPOS DE ESTUDIO

G1	A	X	A1
G2	B	X1	B1
G3	C	X2	C1
G4	D	X3	D1
G5	E	X4	E1

GRUPOS DE EXPOSICIÓN: <i>Pseudomona aeruginosa</i>	EFICACIA: ANTIBACTERIANA		GRUPO DE ESTUDIO
	SI	NO	
G1: PROPOLIS DE APIS MELLÍFERA AL 100%	A	B	CASO 1
G2: DILUCIÒN 75%	C	D	CASO 2
G3: DILUCION 50 %	E	F	CASO 3
G4: DILUCION 25 %	G	H	CASO 4
G5: AMIKACINA	I	J	TESTIGO

X: 100%

X1: 75%

X2: 50%

X3: 25%

X4: tratamiento estándar

con amikacina

2.5. POBLACIÓN, MUESTRA Y MUESTREO

Población: Cepas de *Pseudomonas aeruginosa* cultivadas en laboratorio.

Muestra: 21 cepas bacterianas (Ver anexo 01).

Unidad de análisis: Cada cepa cultivada en el laboratorio.

Unidad de muestreo: Cada placa de cultivo.

Tamaño muestral: Se aplicó la muestra obteniéndose 21 cepas bacterianas. (Ver anexo 01).

Método de muestreo: Por conveniencia.

2.6. CRITERIOS DE SELECCIÓN:

Criterios de inclusión:

- ✓ Placas Petri cultivadas con *Pseudomonas aeruginosa*.

Criterios de exclusión:

- ✓ Placas Petri cultivadas con *Pseudomonas aeruginosa* que se contaminan después de la siembra bacteriana.

2.7. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

La técnica utilizada fue mediante observación directa.

Procedimiento para la recolección de la información: El extracto de Propóleo se obtuvo del pueblo de Íllimo, perteneciente al distrito de Íllimo, departamento de Lambayeque, obteniéndose 300 mg de Propóleo en masa, envuelto en bolsa oscura para no perder sus propiedades.

Para la obtención del extracto etanólico se preparó 100 mg de Propóleo en trozos pequeños y se colocó en un vaso de precipitación agregándole 100 mL de alcohol a 96° llevado al horno a 45° y se procedió a moverlo dos veces al día durante 7 días. Después de ello se filtró con papel filtro Whatman N° 4 en 4 oportunidades. El filtrado se colocó en un Beacker pequeño y se colocó en una estufa a 37° obteniendo aproximadamente el 50% del contenido, obteniendo así el extracto de Propóleo al 100 %.

Se continuó con la compra de los discos de sensibilidad del antibiótico en el laboratorio de BAYOMED HEALTH PERU SAC, siendo la amikacina de 30 mcg la elección para el estudio por estar en el manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana según la serie de Normas Técnicas N° 30. Fue elegida por su eficacia documentada, estabilidad de la molécula y su presencia en el mercado nacional.²⁸

Las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* se obtuvieron del laboratorio de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Cesar Vallejo en Trujillo.

La cepa de *Pseudomonas aeruginosa* fue cultivada en un tubo con medio de cultivo de Mc Conkey refrigerándose por 24 horas para obtener colonias jóvenes.

El inóculo se preparó con 4 mL de solución salina y 5 colonias de *Pseudomonas aeruginosa*. Para remover el exceso de inóculo se utilizó un hisopo estéril rotándolo varias veces con presión en el tubo por encima del nivel del líquido, obteniendo así la turbidez de 0,5 de la escala de Mc. Farland.

Luego se sembró 0.1 mL del inóculo de *Pseudomonas aeruginosa* en las 21 placas petri previamente con el medio de cultivo Mueller Hinton, esparciendo en varias direcciones para asegurar una distribución uniforme de dicho inóculo. Así mismo se preparó los discos mediante el método Kirby y Bauer, empapando cada disco con el extracto de Propóleo con ayuda de micropipetas a 5 µL (100%), 3.5 µL (75%), 2.5 µL (50%), 1 µL (25%).³² Una vez preparados los discos a las diferentes concentraciones se procedió a colocarlos en las placas petri. En cada placa se colocó 5 discos con ayuda de una pinza estéril: un disco al 100%, 75%, 50% y 25% en sentido horario y finalmente en el centro el disco de amikacina de 30 µcg. Cada uno de los discos se colocó bajo presión suave para así poder asegurar su completo contacto con la superficie de la placa, respetando una distancia mínima de 25 mm según OMS.²⁸

Para la incubación se colocó dichas placas en posición invertida dentro de la estufa a 37°C. Después de 24 horas se midió los diámetros de las zonas de inhibición con una regla transparente de 20 cm, sosteniendo la placa hacia arriba, contra una luz continua en la parte posterior de la placa, para evitar una lectura errónea.²⁸

En el Instrumento de recolección de datos se registró el número de placa y el Propóleo con sus respectivas concentraciones. Se realizó una tabulación y un análisis estadístico con los resultados.

VALIDACIÓN Y CONFIABILIDAD DEL INSTRUMENTO

Para evaluar la eficacia antimicrobiana del extracto de Propóleo se utilizó una ficha de recolección de datos basada en el manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana, la cual tiene la validez y confiabilidad por el Instituto Estándar de Clínica y Laboratorio (CLSI) M100-S24, que tiene como puntos de corte de sensibilidad ($\geq 17\text{mm}$) y resistente ($< 17\text{mm}$)²⁷

2.8. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE DATOS

La información fue recolectada en una ficha en Excel y luego fue procesada al programa estadístico SPSS versión 21, lo cual permitió elaborar las tablas y el análisis estadístico correspondiente.

El estadístico aplicado en el presente estudio por ser multivariado fue el ANOVA.

2.9. ASPECTOS ÉTICOS

El presente estudio contó con la autorización de la Facultad de Medicina de la Universidad Cesar Vallejo de Trujillo, en concordancia con las recomendaciones establecidas en la declaración de Helsinki, adoptada por la 18° Asamblea Médica Mundial en Helsinki, Finlandia, junio 1968 y modificada por la Asamblea Médica Mundial en Tokio, enero 2004.

BIOSEGURIDAD

El presente estudio se realizó dentro de las normas de aspectos éticos, según manual de bioseguridad en el laboratorio OMS y la serie de normas técnicas n° 18 del MINSA

1. Se usó en todo momento bata para el trabajo en el laboratorio.
2. Se usó guantes para todos los procedimientos que puedan entrañar contacto directo o accidental con líquidos corporales y otros materiales potencialmente infecciosos. Una vez utilizados, los guantes se retiraron de forma aséptica y a continuación se procedió a lavar las manos.
3. Se lavó las manos después de manipular materiales y antes de abandonar las zonas de trabajo del laboratorio.
4. Estuvo prohibido usar las prendas protectoras fuera del laboratorio.
5. Se utilizó zapatos protectores que cubrían completamente los pies.
6. Estuvo prohibido comer, beber, fumar, aplicar cosméticos o manipular lentes de contacto en la zona de trabajo.

7. El cabello largo, estuvo en todo momento recogido y cubierto.
8. El laboratorio se mantuvo ordenado, limpio y libre de materiales no relacionados con el trabajo.
9. Las superficies de trabajo se descontaminaron antes de empezar el trabajo después de todo derrame de material potencialmente peligroso y al final de cada jornada de trabajo.
10. Todos los materiales, muestras y cultivos contaminados se descontaminaron antes de eliminarlos o de limpiarlos para volverlos a utilizar.
11. Se usó en todo momento el dispositivo de pipeteo.
12. No se insufló aire en un líquido que contuvo agentes infecciosos.
13. Los reactivos estuvieron etiquetados y almacenados en viales adecuados, con tapa rosca.
14. En el laboratorio hubo un equipo de primeros auxilios.
15. Se informó inmediatamente cualquier accidente al jefe de laboratorio.

III. RESULTADOS

TABLA 01

Indicadores estadísticos sobre el tamaño del halo de inhibición de *Pseudomonas aeruginosa* en distintas diluciones del extracto de Propóleo y amikacina de 30 µcg.

	MEDIA	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	MEDIANA	MÍNIMO	MÁXIMO
AMIKACINA	27.7	1.7	28.0	25.0	32.0
Propóleo al 100%	3.1	3.4	0	0	8.0
Propóleo al 25 %	0	0	0	0	0
Propóleo al 50 %	0	0	0	0	0
Propóleo al 75 %	0	0	0	0	0

FUENTE: LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DE UCV

Interpretación: el tamaño de halo de inhibición del Propóleo al 25%, 50%, y 75% en bacterias de *Pseudomonas aeruginosa* encontramos que sus dimensiones fueron nulas (00mm) a diferencia del Propóleo al 100% donde se obtuvo una media de 3.1 mm.

En el control, que fue la amikacina 30 µcg, se obtuvo una media de 27.7 mm, su desviación respecto a la media de 1.7 mm considerando también el valor máximo y mínimo de 32 y 25 mm, respectivamente.

TABLA 02

Efecto de las diluciones de Propóleo y amikacina 30 µg sobre *Pseudomonas aeruginosa*

	Suma de cuadrados	Sig.
Entre grupos	12338.1	.000
Dentro de grupos	292.9	
Total	12630.9	

FUENTE: LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DE UCV

Interpretación: en el análisis de varianza de la tabla 02 se determinó la diferencia significativa con $p < 0.01$ entre todas las diluciones, implicando entonces que algunos de ellos tienen mayor efecto.

TABLA 03

Eficacia antibacteriana de la amikacina sobre las cepas de *Pseudomonas aeruginosa*

EFECTO	AMIKACINA 30µG	
	N	%
SENSIBLE	21	100.0
INDIFERENTE	0	0
RESISTENTE	0	0
TOTAL	21	100

FUENTE: LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DE UCV

Interpretación: en la tabla nº 3 se muestra que el 100% de la amikacina de 30 µg fue sensible porque tuvo eficacia antibacteriana a la *Pseudomonas aeruginosa*

TABLA 04

Comparación de la eficacia antibacteriana del Propóleo a diferentes diluciones y la amikacina sobre *Pseudomonas aeruginosa*

(I) TRAT		Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
AMIKACINA	10	24,57143*	.52812	.000	23.1	26.0
	25	27,71429*	.52812	.000	26.2	29.2
	50	27,71429*	.52812	.000	26.2	29.2
	75	27,71429*	.52812	.000	26.2	29.2
100	0	-24,57143*	.52812	.000	-26.0	-23.1
	25	3,14286*	.52812	.000	1.7	4.6
	50	3,14286*	.52812	.000	1.7	4.6
	75	3,14286*	.52812	.000	1.7	4.6
25	0	-27,71429*	.52812	.000	-29.2	-26.2
	10	-3,14286*	.52812	.000	-4.6	-1.7
	50	0.00000	.52812	1.000	-1.5	1.5
	75	0.00000	.52812	1.000	-1.5	1.5
50	0	-27,71429*	.52812	.000	-29.2	-26.2
	10	-3,14286*	.52812	.000	-4.6	-1.7
	25	0.00000	.52812	1.000	-1.5	1.5
	75	0.00000	.52812	1.000	-1.5	1.5
75	0	-27,71429*	.52812	.000	-29.2	-26.2
	10	-3,14286*	.52812	.000	-4.6	-1.7
	25	0.00000	.52812	1.000	-1.5	1.5
	50	0.00000	.52812	1.000	-1.5	1.5

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

FUENTE: LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DE UCV

Interpretación: al comparar con la distribución t de student respecto a las dimensiones encontramos que la amikacina posee diferencia significativa $p < 0.01$ sobre las diluciones del Propóleo al 25%, 50%, 75% y 100%.

TABLA 05

Homogeneidad del efecto de Propóleo y sus diluciones al 25%, 50%, 75%, 100%, y la amikacina 30 μg sobre *Pseudomonas aeruginosa*

TRAT	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
25	21	0		
50	21	0		
75	21	0		
100	21		3.1	
AMIKACINA	21			27.7
Sig.		1.000	1.0	1.0

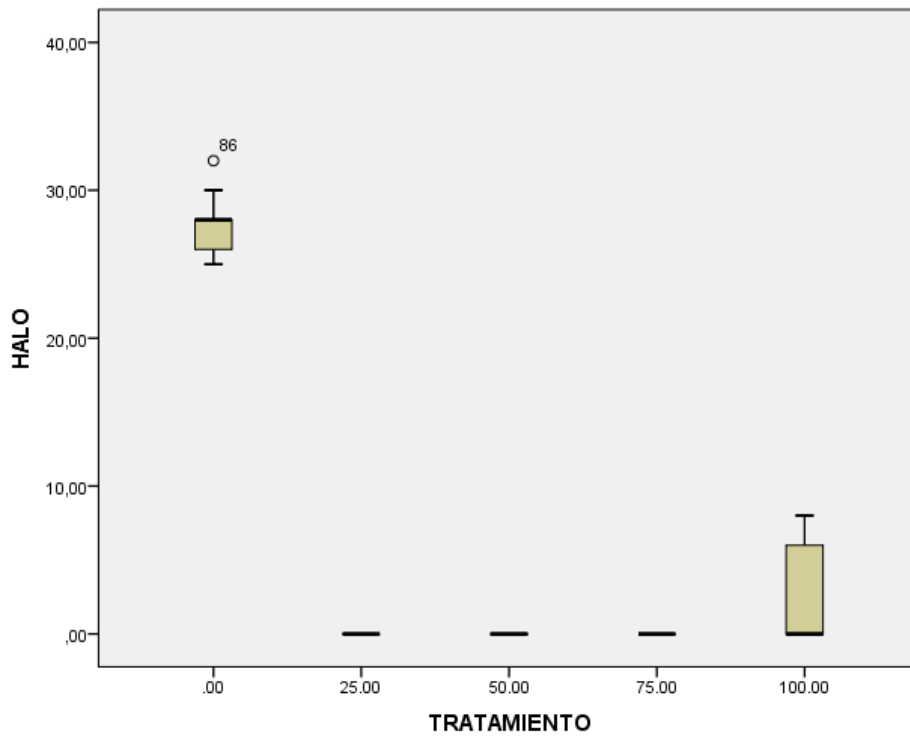
Se visualizan las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Utiliza el tamaño de la muestra de la media armónica = 21,000.

Interpretación: la tabla 05 expresa la agrupación de subconjuntos de las diluciones del Propóleo y la amikacina según su homogeneidad del efecto usando la técnica de Tukey con $p < 0.01$. En la que se considera que el Propóleo al 25%, 50% y 75% tienen efecto nulo, pero al 100% poco efecto (3.1 mm). Sin embargo, comparando, la amikacina tiene buen efecto antibacteriano sobre *Pseudomonas aeruginosa* 30 μg (ver figura 01).

FIGURA 01

Homogeneidad del efecto de Propóleo al 25%, 50%, 75%, 100%, y la amikacina 30 μ g sobre *Pseudomonas aeruginosa*



IV. DISCUSIÓN

Las patologías causadas por gérmenes nosocomiales son las más difíciles de tratar, dentro de los más importantes esta *Pseudomonas aeruginosa*.

Pseudomonas aeruginosa es una de las bacterias que produce infección en pacientes críticos e inmunodeprimidos; teniendo factores de virulencia, toxinas y enzimas que protegen a la bacteria. Además son bacterias oportunistas que crecen en una gran variedad de ambientes y resisten temperaturas de 4°C a 42°C. Todo ello condiciona a que su tratamiento tenga un tiempo de recuperación largo porque presenta un alto grado de resistencia antibacteriana. Por lo que en el presente trabajo experimental se evaluó la eficacia antibacteriana de las concentraciones del extracto de Propóleo sobre *Pseudomonas*.

En este estudio se utilizó Propóleo de Íllimo (Perú) que es actualmente muy usado por la medicina alternativa para combatir infecciones producidas por hongos, virus y bacterias. Encontrándose en la tabla 1 que el tamaño del halo de inhibición del Propóleo al 25%, 50% y 75% fueron nulas a diferencia del Propóleo 100% que se obtuvo una media de 3.1 mm; es decir a mayor concentración de Propóleo, mayor es la medida del halo de inhibición. Demostrándose así que no hay efecto antibacteriano del Propóleo a sus diferentes concentraciones sobre el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa*, sin embargo con respecto a la amikacina 30 µg se obtuvo una media de 27,7 mm.

Por lo que en este estudio se rechaza la H1, aceptando la H0 donde no hay efecto antibacteriano del Propóleo a sus diferentes concentraciones. En comparación con los estudios anteriores refieren que su actividad antibacteriana depende de la región donde se recolecta, método de proceso y almacenamiento; de acuerdo a Samara N et al, esta compararon la composición cualitativa del Propóleo de dos zonas de Cauca, demostrando que para la inhibición fue mejor la de Buenos Aires que el de Totoró frente a *Pseudomonas aeruginosa*, al inhibir su crecimiento a una concentración inferior ($p < 0.05$), además demostraron que depende de la composición, como por ejemplo los flavonoides y taninos. Pero también existen compuestos como flavonoides y compuestos como éster fenilético del ácido cafeico con propiedades biológicas en apoptosis y metástasis.

Si bien la eficacia antibacteriana del Propóleo frente a *P. aeruginosa* ha sido estudiada por algunos autores, demostrando así que a concentraciones elevadas de Propóleo existe inhibición de *Pseudomonas*; según los resultados obtenidos en la tabla 01 se observa que el tamaño de halo de inhibición del Propóleo al 100% sobre bacterias *Pseudomonas aeruginosa* el efecto inhibitorio es

mayor comprado a las otras concentraciones; con lo que se llega a concluir que mediante la técnica de Kirby Bauer no hay efecto inhibitorio en cada una de las concentraciones del extracto de Propóleo. Sin embargo el control con la amikacina a 30 mcg presenta efecto inhibitorio contra dicha bacteria donde se obtuvieron valores entre 32 y 25 mm de diámetro. Pero además con el análisis de varianza (Tabla 2) se determinó que presenta una diferencia significativa con $p < 0.01$ entre todas las diluciones.

Así tenemos: Alayo ⁶ en su estudio, comparó el halo de inhibición del crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* en función a cuatro concentraciones de extracto etanólico de Propóleo y a la sulfadiazina, encontrando que al igual que este estudio no existe efecto inhibitorio con el Propóleo contra *Pseudomonas aeruginosa*. Sin embargo García M et al ⁸, describió que *Pseudomonas* fue inhibida a grandes concentraciones y además concluyen que el Propóleo tiene mayor eficacia antibacteriana para las bacterias gram positivas comparado contra las bacterias gram negativas, pero García a comparación de este estudio trabajo con dos extractos etanólicos y determinó CMI, obteniendo aunque a concentraciones elevadas actividad antimicrobiana.

Tolosa que en su estudio trabajó con 10 muestras la bacteria con mayor resistencia *S. Typhi* y la *P. aeruginosa* es la más sensible; en nuestro estudio se evaluaron 21 repeticiones obteniendo así mayor confiabilidad, con lo que podemos decir que no existe eficacia antibacteriana contra la *Pseudomonas aeruginosa*.

A pesar de ello un aspecto importante es que no se han encontrado muchos trabajos de investigación del efecto antibacteriano del Propóleo sobre *Pseudomonas*, de esta manera se está contribuyendo a dar como aporte que el Propóleo no presenta efecto antibacteriano sobre dicho microorganismo, cuyo estudio no debería aplicarse para mejorar la salud ni tratar enfermedades producidas por *Pseudomonas*.

Respecto a la distribución t de Student (tabla 4 y 5) se encontró que la amikacina posee diferencia significativa $p < 0.01$ sobre las diluciones del Propóleo, puesto que se obtuvo una media de 27.7 mm teniendo como criterio que el diámetro sea mayor o igual a 17 mm, explicando así la eficacia de dicho medicamento.

Por lo que se concluye que el propóleo posee actividad antibacteriana a grandes concentraciones, y que posee actividad antibacteriana sobre cepas gram positivas mas no contra las gram negativas. Esto explicaría que en los antecedentes no se encuentra o es muy nula la actividad bacteriana del Propóleo contra la *Pseudomonas aeruginosa*.

V. CONCLUSIONES

- El extracto de Propóleo no presenta actividad antibacteriana in vitro sobre *Pseudomonas aeruginosa*
- Las concentraciones del extracto de Propóleo ensayadas no tuvieron efecto inhibitorio sobre *Pseudomonas aeruginosa*, pero si hubo efecto antibacteriano de amikacina sobre dicha cepa.
- La susceptibilidad bacteriana in vitro del extracto de Propóleo varían en sus diferentes concentraciones, teniendo mayor efecto antimicrobiano la concentración al 100%.

VI. RECOMENDACIONES

- Realizar estudios que utilicen extractos de Propóleo de otras zonas y a mayor concentración para evaluar el efecto antibacteriano sobre el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa*
- Realizar estudios de investigación que determinen la concentración mínima inhibitoria del extracto de Propóleo sobre la cepa de *Pseudomonas aeruginosa*.
- Continuar investigaciones que promuevan la búsqueda de alternativas de origen natural para el uso humano sobre bacterias gram negativas.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Medicina tradicional: definiciones. OMS [Internet] 2014 [07 de noviembre del 2014]. Disponible en: http://www.who.int/topics/traditional_medicine/definitions/es/
2. Lozano S, Rodríguez F y Alva C. Pueblo cont [revista en Internet] 2012 [10 de setiembre del 2014]; 23 (1). Disponible en: [http://www.upao.edu.pe/publicaciones/PUEBLO_CONTINENTE/UPAO_PUEBLO_CONTINENTE_23\(1\)_2012.pdf](http://www.upao.edu.pe/publicaciones/PUEBLO_CONTINENTE/UPAO_PUEBLO_CONTINENTE_23(1)_2012.pdf)
3. Peña A y Paco O. Medicina alternativa: intento de análisis. An Fac Med [revista en Internet] 2007 [10 de setiembre del 2014]; 68(1). Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/afm/v68n1/a12v68n1>
4. <http://www.essalud.gob.pe/2013/05/06/en-essalud-con-medicina-complementaria-se-disminuye-hasta-en-100-el-uso-de-antidepresivos/>
5. Essalud. Vida y Salud Integral [Internet] 2012 [10 de setiembre del 2014]; 3(3). Disponible en: http://www.essalud.gob.pe/downloads/boletin4n3_2012.pdf
6. Alayo G. Efecto in vitro del propóleo sobre Pseudomona aeruginosa y Staphylococcus aureus comparado con sulfadiazina de plata. Trujillo. Biblioteca digital. Oficina de sistemas e informática UNT; 2014
7. TOLOSA, L y CAÑIZARES, E. Obtención, caracterización y evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos de Campeche. Ars Pharmaceutica. BIOtecnia [revista en Internet] 2002 [31 de mayo de 2016]; 43(1-2): 187-204. Disponible en: <http://farmacia.ugr.es/ars/pdf/233.pdf>
8. Garcia B, Medina R, Hidalgo P, Delgado M, Truffin E, y Gómez R. Actividad in vitro del Propóleos frente a Patógenos Bacterianos aislados de Infecciones Humanas. Latin American Journal of Pharmacy [revista en Internet] 2007 [31 de mayo de 2016]; 26 (1). Disponible en: http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/mednat/actividad_in_vitro_del_propoleos.pdf
9. Bispo W, Oliveira E, Alvino V, Araujo B, Wanderlei D, y Porfirio Z. Atividade antimicrobiana de frações da própolis vermelha de Alagoas, Brasil. Semina: Ciências Biológicas e da Saúde [revista en Internet] 2012 [31 de mayo de 2016]; 33 (1):03-10. Disponible en: <http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/seminabio/article/viewFile/4589/11065>
10. Samara N, Benitez N, y Cabezas F. ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y COMPOSICION CUALITATIVA DE PROPOLEOS PROVENIENTES DE DOS ZONAS CLIMATICAS DEL

- DEPARTAMENTO DEL CAUCA. Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial. 2011; 9 (1): 8 – 16
11. Gebara E, Lima L, y Mayer M. Propolis antimicrobial activity against periodontopathic bacteria. Braz. J. Microbiol [revista en Internet] 2002 [31 de mayo de 2016]; 33 (4). Disponible en: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822002000400018
 12. Velazquez C, Navarro M, Acosta A, Angulo A, Dominguez Z, Robles R, Robles-Zepeda R, Lugo E, Goycoolea F, Velazquez E, Astiazaran H, y Hernandez J. Antibacterial and free-radical scavenging activities of Sonoran propolis C. Velazquez1, M. Journal of Applied Microbiology ISSN [revista en Internet] 2007 [31 de mayo de 2016]; 103: 1747-1756. Disponible en: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2672.2007.03409.x/pdf>
 13. Ara A. Los Grandes Remedios Naturales [LIBRO EN LINEA]. Madrid: EDAF. 1999. [Citado el 8 de noviembre del 2014]. Disponible en: http://books.google.com.pe/books?id=W_yW1P3KmswC&printsec=frontcover&dq=Los+Grandes+Remedios+Naturales&hl=es&sa=X&ei=ymJiVPaENsSpNpLJgugH&ved=0CBOQ6AEwAA#v=onepage&q=Los%20Grandes%20Remedios%20Naturales&f=false
 14. Almodóvar M. La fórmula Almodóvar [LIBRO EN LINEA]. 2ª ed. Madrid: Nowtilus; 2009. [Citado el 8 de noviembre del 2014]. Disponible en: <http://books.google.com.pe/books?id=BRMu4SBWBdcC&pg=PA145&dq=propoleo&hl=es-419&sa=X&ei=U0xrVLbgGIGpNtiUgZAM&ved=0CEYQ6AEwCTgK#v=onepage&q&f=false>
 15. Basulto J y Cáceres J. Comer y correr, Desmontando los mitos de la alimentación de los runners [LIBRO EN LINEA]: Debolsillo; 2014. [Citado el 8 de noviembre del 2014]. Disponible en: [http://books.google.com.pe/books?id=ZlfdAgAAQBAJ&pg=PT205&dq=El+t%C3%A9rmino+%E2%80%9Cprop%C3%B3leo%E2%80%9D+no+es+aceptado+por+la+Real+Academia+Espa%C3%B1ola+\(RAE\),+aunque&hl](http://books.google.com.pe/books?id=ZlfdAgAAQBAJ&pg=PT205&dq=El+t%C3%A9rmino+%E2%80%9Cprop%C3%B3leo%E2%80%9D+no+es+aceptado+por+la+Real+Academia+Espa%C3%B1ola+(RAE),+aunque&hl)
 16. Gil A. tratado de nutrición [LIBRO EN LINEA]. 2ª ed. Madrid: Panamericana; 2010 [citado el 18 de noviembre de 2014]. Disponible en: <http://books.google.com.pe/books?id=hcwBJOFNvqYC&pg=PT270&dq=propoleo+flavonoides&hl=es-419&sa=X&ei=qrJrVP63NmiYgwT8k4CgCQ&ved=0CDYQ6AEwAw#v=onepage&q=propoleo%20flavonoides&f=false>
 17. Morales A. Frutoterapia, nutrición y salud [LIBRO EN LINEA]. España: EDAF; 2002 [citado el 18 de noviembre de 2014]. Disponible en:

- <http://books.google.com.pe/books?id=owvxEMHEHLgC&pg=PT90&dq=Es+un+complejo+de+sustancias+de+apariencia+resinosa+y+adherente+que+posee+una+gama+de+nutrientes+que+incluyen&hl=es-419&sa=X&ei=eVRrVOjPOoKXNtfPgNgD&ved=0CBsQ6AEwAA#v=onepage&q=Es%20un%20complejo%20de%20sustancias%20de%20apariencia%20resinosa%20y%20adherente%20que%20posee%20una%20gama%20de%20nutrientes%20que%20incluyen&f=false>
18. Pirre Jean-Prost, Yves Le Conte. Apicultura Conocimiento de la abeja Manejo de la Colmena [LIBRO EN LINEA]. 4ª ed. Madrid: Grupo Mundi-Prensa; 2006. Madrid: Díaz de Santos; 2007 [citado el 18 de noviembre de 2014]. Disponible en: http://books.google.com.pe/books?id=iWgJAQAAQBAJ&pg=PA374&dq=Apicultura+Conocimiento+de+la+abeja+Manejo+de+la+Colmena&hl=es-419&sa=X&ei=P99rVPeuMsWkNv_xgKAD&ved=0CBsQ6AEwAA#v=onepage&q=Apicultura%20Conocimiento%20de%20la%20abeja%20Manejo%20de%20la%20Colmena&f=false
 19. Botí F. Mosaico de memorias (II) [LIBRO EN LINEA]. Buenos Aires: Dunken; 2005 [citado el 8 de noviembre de 2014]. Disponible en: [http://books.google.com.pe/books?id=8yyLjeMCMFMC&pg=PR2&dq=Mosaico+de+memorias+\(II\).&hl=es-419&sa=X&ei=7VlrVJaVAoumNqSJgegL&ved=0CCYQ6AEwAA#v=on](http://books.google.com.pe/books?id=8yyLjeMCMFMC&pg=PR2&dq=Mosaico+de+memorias+(II).&hl=es-419&sa=X&ei=7VlrVJaVAoumNqSJgegL&ved=0CCYQ6AEwAA#v=on)
 20. Morales J. Nutriterapia, salud y longevidad ¿Qué comer para vivir más y mejor?. [LIBRO EN LINEA] Madrid: Díaz de Santos; 2007 [citado el 8 de noviembre de 2014]. Disponible en: <http://books.google.com.pe/books?id=dw0juWUvp60C&pg=PA355&dq=La+medicina+oficial,+hace+un+siglo+que+le+reconoci%C3%B3+propiedades+terap%C3%A9uticas,+y+en+los+a%C3%B1os+60+se+profundiz%C3%B3+en+su+estudio+cient%C3%ADfico&hl=es-419&sa=X&ei=spdrVOPGGMmqNvT2g9gG&ved=0CBsQ6AEwAA#v=onepage&q=La%20medicina%20oficial%20hace%20un%20siglo%20que%20le%20reconoci%C3%B3%20propiedades%20terap%C3%A9uticas%20y%20en%20los%20a%C3%B1os%2060%20se%20profundiz%C3%B3%20en%20su%20estudio%20cient%C3%ADfico&f=false>
 21. Phyllis A. recetas nutritivas que curan [LIBRO EN LINEA]. 2ª ed. New York: Elliot Glass; 1997 [citado el 8 de noviembre de 2014]. Disponible en: http://books.google.com.pe/books?id=TrDJvmggG-IC&printsec=frontcover&dq=recetas+nutritivas+que+curan&hl=es-419&sa=X&ei=AFprVNbjGsijNp6Fg_AM&ved=0CDAQ6AEwAA#v=onepage&q=recetas%20nutritivas%20que%20curan&f=false
 22. Lesser R. Manejo y crianza practica de las abejas, como usar los productos de las abejas en la salud del hombre [LIBRO EN LINEA]. Chile: Andrés Bello; 1987 [citado el 18 de noviembre

- de 2014]. Disponible en:
[http://books.google.com.pe/books?id=GUKUprPNssUC&pg=PA124&dq=PROPOLEO+dermat%C3%B3logos+\(machucones,+heridas+de+corte,+accidentes,+quemaduras,+tambi%C3%A9n+de+sol,+for%C3%B3nculos,+pus,+abscesos,+callos,+verrugas&hl=es-419&sa=X&ei=vZlrVPWWDIqhNsiPgqAE&ved=0CCAQ6AEwAA#v=onepage&q=PROPOLEO%20dermat%C3%B3logos%20\(machucones%20heridas%20de%20corte%20accidentes%20quemaduras%20tambi%C3%A9n%20de%20sol%20for%C3%B3nculos%20pus%20abscesos%20callos%20verrugas&f=false](http://books.google.com.pe/books?id=GUKUprPNssUC&pg=PA124&dq=PROPOLEO+dermat%C3%B3logos+(machucones,+heridas+de+corte,+accidentes,+quemaduras,+tambi%C3%A9n+de+sol,+for%C3%B3nculos,+pus,+abscesos,+callos,+verrugas&hl=es-419&sa=X&ei=vZlrVPWWDIqhNsiPgqAE&ved=0CCAQ6AEwAA#v=onepage&q=PROPOLEO%20dermat%C3%B3logos%20(machucones%20heridas%20de%20corte%20accidentes%20quemaduras%20tambi%C3%A9n%20de%20sol%20for%C3%B3nculos%20pus%20abscesos%20callos%20verrugas&f=false)
23. Murray P, Rosenthal K, Pfaúer M. R. Microbiología médica. 5ª ed. España: Elsevier; 2007.
 24. Hardman, J.G.; Limbird, L.E. Goodman y Gilman. Bases Farmacológicas de la Terapéutica. Mc Graw Hill Interamericana. 2 volúmenes. 10ª Edición. 2001.
 25. Real Academia Española. Diccionario de la Lengua Española. Edición digital. 22ª ed. 2001.
 26. Reyes C. Actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de propóleo peruano sobre cultivos de bacterias anaerobias frecuentes en pacientes con periodontitis crónica. Tesis [Internet] 2010 [07 de noviembre del 2014]. Disponible en: http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/cybertesis/3273/1/reyes_cc.pdf
 27. Daoud Z. EFECTO DE CONCENTRACIONES SUBINHIBITORIAS DE ANTIMICROBIANOS SOBRE LAS INTERACCIONES FIBRONECTINA-Staphylococcus aureus. Tesis [Internet] 1995 [21 de noviembre del 2014]. Disponible en: <http://biblioteca.ucm.es/tesis/19911996/D/1/D1021401.pdf>
 28. Clinical and Laboratory Standards Institute. M100-S24 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement [Internet] 2014 [18 de noviembre del 2014]; 34(1). Disponible en: <http://www.ctmperu.org.pe/anexos/bibliotecavirtual/exposiciones/guia%20CLSI%202014.pdf>
 29. MINSA. MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA LA PRUEBA DE SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA POR EL MÉTODO DE DISCO DIFUSIÓN. serie de norma técnica N° 30 [Internet] 2002 [18 de noviembre de 2014]. Disponible en: http://www.ins.gob.pe/repositorioaps/0/4/jer/-1/manua_l%20sensibilidad.pdf

ANEXOS

ANEXO N°01

Fórmula para determinar el tamaño de muestra

$$n = \left(Z_{\frac{\alpha}{2}} + Z_{\beta} \right)^2 \delta^2$$

$$n = (1.96 + 0.846)^2 1.5^2$$

$$n = 17$$

Donde:

$$Z\left(\frac{\alpha}{2}\right) = 1.96$$

$$Z\beta = 0.846$$

δ = Variación relativa de la diferencia (1.5)

$$n = 17$$

ANEXO N°02

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Los datos obtenidos serán recolectados en la siguiente ficha:

Método empleado: Kirby Bauer ³¹

Cepa empleada: Pseudomona aeruginosa

Extracto de Propolis de Apis mellífera

DIAMETROS DE HALOS DE IHIBICION DE CRECIMIENTO BACTERIANO (MM)					
CONCENTRACION DEL EXTRACTO DE PROPOLEO AL:					
	25%	50%	75%	100%	amikacina
	mm	mm	Mm	mm	mm
1	0	0	0	0	28
2	0	0	0	7	32
3	0	0	0	6	26
4	0	0	0	0	27
5	0	0	0	8	28
6	0	0	0	6	26
7	0	0	0	6	25
8	0	0	0	0	26
9	0	0	0	0	30
10	0	0	0	0	27
11	0	0	0	0	29
12	0	0	0	7	26
13	0	0	0	0	28
14	0	0	0	0	28
15	0	0	0	0	29
16	0	0	0	6	30
17	0	0	0	0	25
18	0	0	0	0	28

19	0	0	0	6	28
20	0	0	0	7	28
21	0	0	0	7	28

ANEXO N°03



Figura 1. Maceración del extracto etanólico con 100 mg de Propóleo en trozos pequeños y 100 mL de alcohol a 96°.



Figura 2: Filtración con papel filtro Whatman N° 4.



Figura 3: Filtración con papel filtro Whatman N° 4 en 4 oportunidades.



Figura 4: Filtración con papel filtro Whatman N° 4 en 4 oportunidades para luego colocarlo en una estufa a 37°.



Figura 5: Preparación de los discos mediante el método Kirby y Bauer para luego ser empapados con el extracto de Propóleo a sus diferentes concentraciones.



Figura 6: Discos empapados con el extracto de Propóleo a sus diferentes concentraciones.