

Actividad bacteriostática y bactericida de la tintura de propóleos sobre bacterias enteropatógenas

Marielsa Gil^{1*}, Amarily Perelli², Riloarbert, Alvarado¹, Yuneidi Arias¹, Eucaris Blumenthal¹

RESUMEN

Actividad bacteriostática y bactericida de la tintura de propóleos sobre bacterias enteropatógenas

El propóleo es una sustancia resinosa que las abejas *Apis mellifera* adultas producen para garantizar la total asepsia de la colmena. Otras especies de abejas también producen propóleos. Con el objeto de evaluar la actividad bacteriostática y bactericida *in vitro* de la tintura etanólica de propóleos comercial al 70 % v/v proveniente de un apiario del Estado Cojedes, Venezuela sobre bacterias enteropatógenas ATCC. Se utilizaron *Salmonella enterica subsp enterica* serotipo paratyphi A, *Salmonella enterica subsp enterica* serotipo paratyphi B, *Salmonella enterica subsp enterica* serotipo typhi, *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri*, *Yersinia enterocolitica* y *Escherichia coli* enterohemorrágica (O157:H7). Las cepas mencionadas se expusieron a distintas concentraciones de tintura de propóleos durante 24 horas para determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Mínima Bactericida (CMB) utilizando el método de macrodilución en tubos. Resultados: *Salmonella paratyphi A* fue la única bacteria con efecto inhibitorio total en agar BHI. En las demás bacterias se evidenció efecto bacteriostático parcial. *Yersinia enterocolitica* fue la más sensible con una CMI 4% y CMB 8 %, seguida por *Shigella sonnei*, *Salmonella paratyphi B*, *Salmonella typhi* y *Escherichia coli* (O157:H7), con CMI 8% y CMB 11% y finalmente *Shigella flexneri* y *Salmonella paratyphi A* fueron las más resistente con CMI 11% y CMB 15%. Se demostró que la tintura de propóleos tiene efecto bacteriostático y bactericida *in vitro* en las cepas estudiadas y que el etanol presente como solvente no es el responsable de tal efecto.

Palabras clave: tintura de propóleo, concentración mínima inhibitoria, concentración mínima bactericida, bacterias enteropatógenas.

ABSTRACT

Bacteriostatic and bactericidal activity of propolis tincture on enteropathogenic bacteria

Propolis is a resinous substance produced by adult bees *Apis mellifera* to ensure complete asepsis of the hive. Other species of bees also produce propolis. The aim of this study was to assess the bacteriostatic and bactericidal activity *in vitro* of commercial ethanolic tincture of propolis 70% v/v from an apiary in Cojedes State, Venezuela on enteropathogenic bacteria ATCC. Used

Salmonella enterica subsp enterica suptype paratyphi A, *Salmonella enterica subsp enterica* suptype paratyphi B, *Salmonella enterica subsp enterica* subtype typhi, *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri*, *Yersinia enterocolitica*, and *Escherichia coli* (O157:H7). The strains mentioned were exposed to different concentrations of propolis for 24 hours to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) using the macrodilution method in tubes. Results: *S. paratyphi A* was the only bacterium with a total inhibitory effect on agar BHI. In other bacteria, a partial bacteriostatic effect was observed. *Y. enterocolitica* was the most sensitive with a CMI 4% and CMB 8 %, followed by *E. coli* (O157:H7). *S. typhi*, *S. paratyphi B* and *S. sonnei* with CMI 8% and CMB 11% and finally *S. flexneri* and *S. paratyphi A* were the most resistant with CMI 11% and CMB 15%. Results indicate that propolis tincture has a bacteriostatic and bactericidal effect *in vitro* in the strains studied, and that such effect is not due to the ethanol present as solvent.

Key words: propolis tincture, minimum inhibitory concentration, minimum bactericidal concentration, enteropathogenic bacteria.

INTRODUCCIÓN

El propóleo es una sustancia resinosa que las abejas adultas producen para garantizar la asepsia de la colmena. Entre las especies de abejas que producen propóleos están *Apis mellifera*, *Melipona quadrfasciata*, *Melipona compressipes*, *Tetragonisca angustula* y *Nannotrigona sp.* Sin embargo, está demostrado que los propóleos de las abejas africanizadas (*Apis mellifera*) presentan mayor efectividad antimicrobiana que las de abejas europeas (1). Las características organolépticas varían según su origen botánico; por lo general tiene un sabor acre, frecuentemente amargo, de olor agradable. Etimológicamente su nombre deriva del griego “pro” que significa en defensa de; y “polis” que significa ciudad, indicando de esta manera que el material se encuentra a la entrada del panal (2). La abeja lo utiliza para desinfectar la colmena, sellar grietas y embalsamar intrusos que no puede expulsar por su tamaño (3). La composición química del propóleo es compleja y variable y depende del lugar de origen, pero es sabido que posee terpenos, polisacáridos, ácidos aromáticos, polifenoles, ésteres de ácidos fenólicos, minerales, vitaminas y aminoácidos (1, 3, 4).

Diversos estudios tanto en Europa como en Latinoamérica han descrito las numerosas propiedades medicinales del propóleo entre las cuales destaca la actividad antibacteriana sobre distintos géneros como (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sp.*, *Micrococcus sp.*, *Bacillus sp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Elizabethkingia meningoseptica* entre otras), pero con mayor eficacia sobre bacterias Gram positivas y en menor grado sobre bacterias

¹Laboratorio de Diagnóstico Bacteriológico, Dpto. de Microbiología, Escuela de Ciencias Biomédicas y Tecnológicas, Universidad de Carabobo Venezuela.

²Departamento de Metodología de Investigación, Facultad de Odontología, Universidad de Carabobo

*Autor de correspondencia: Marielsa Gil Febres.

E-mail: marielsagilfd@hotmail.com

Recibido: Enero 2012

Aprobado: Agosto 2012

Gram negativas, ya que esta actividad varía en efectividad de acuerdo a las características del ambiente donde se desarrollan las abejas, lo cual influye en la composición del propóleo (1, 4, 5).

Por otra parte, se conoce que las bacterias en los últimos años han sido capaces de desarrollar innumerables mecanismos de resistencia ante los antibióticos; entre los más destacados se encuentran: la producción de enzimas que inactivan al antibiótico, como por ejemplo las betalactamasas, especialmente las de espectro extendido (BLEE); la expresión de sistemas *efflux* de excreción que evitan que el fármaco alcance su blanco intracelular (bomba de eflujo), las mutaciones que impiden el contacto del antibiótico con el sitio de acción impidiendo la entrada del mismo a la bacteria o generando una vía metabólica alterna que evite la acción del fármaco (6, 7). Todos estos mecanismos de resistencia van en aumento, problema que preocupa a los especialistas en el área de la salud, debido a los costos que conlleva la compra de nuevos y eficientes antibióticos con pocos efectos secundarios para el tratamiento de las infecciones por agentes multiresistentes (8).

Los bacilos entéricos, cuyo hábitat natural en algunos casos es el ser humano, no escapan a esta realidad, y además están asociados a diversos tipos de infecciones como neumonía, abscesos, meningitis, septicemia, infección intestinal, siendo la causa principal de las infecciones intrahospitalarias (9). Esta familia incluye géneros como *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Proteus*, entre otros. Algunos microorganismos entéricos, como *Escherichia coli*, forman parte de la flora normal e incidentalmente causan enfermedad; mientras que *Salmonella*, *Shigella* y *Yersinia enterocolitica* con gran frecuencia son patógenas para los humanos; éstos tienen reservorios muy variados y dan lugar a diversas enfermedades que van desde las enteritis causadas por las *Shigella*, *Salmonellas* y *Escherichia coli* 0:157, hasta sepsis causada por *Yersinia enterocolitica* (9, 10).

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) (11), el microorganismo *E. coli* es responsable cada año de la muerte de 380.000 niños en todo el mundo y de 210 millones de episodios de diarrea. En resumen, las enfermedades diarreicas son las responsables de unos tres millones de muertes en todo el mundo (11, 12). En Venezuela, según el Ministerio del Poder Popular para la Salud las enfermedades infecciosas intestinales representan una de las principales causas de morbilidad y la tercera de mortalidad en niños menores de cinco años (13).

La preocupación en el campo de la salud es combatir estos microorganismos de forma rápida y eficaz. En la antigüedad, el propóleo fue ampliamente utilizado por diferentes culturas con diversas finalidades, entre ellas en medicina. Con el posterior desarrollo de la química farmacéutica y al igual que ocurrió con los tratamientos fitoterápicos, el propóleo dejó de utilizarse (14).

Sin embargo, en la actualidad con los diversos mecanismos de resistencia desarrollados por las bacterias frente a los antibióticos, se hace necesario la búsqueda de alternativas que ayuden a solventar la situación.

Es por ello que el propóleo se ha convertido en un producto de interés en el campo de la salud, por lo cual se están realizando estudios en relación a las acciones, efectos y posibles usos en las áreas de Biología, Medicina humana y Veterinaria (5, 15, 16).

En Venezuela, son escasos los estudios sobre la acción bacteriostática y bactericida del propóleo autóctono de diversas regiones del país. Sin embargo, hay reportes de su eficacia sobre cepas de: *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomona aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Elizabethkingia meningoseptica*, con el propóleo de Cojedes y sobre *Micrococcus luteus* y *Staphylococcus aureus* con el propóleo de Miranda (16,17). Es por ello que el objetivo del presente estudio fue determinar la concentración mínima inhibitoria ó bacteriostática (CMI) y bactericida (CMB) de una tintura de propóleos producido en un Apiario del estado Cojedes sobre el crecimiento *in vitro* de bacterias enteropatógenas.

MATERIALES Y METODOS

Tintura de Propóleos

Para el estudio se utilizó una tintura de propóleo comercial al 70% fabricada por un Apiario ubicado en el Sector El Paradero del Municipio Lima Blanco del Edo. Cojedes, Venezuela. Este Apiario trabaja con propóleos producidos por abejas *Apis mellifera* y el solvente que utilizan es el etanol. Cepas Bacterianas

Las cepas utilizadas fueron las siguientes bacterias enteropatógenas ATCC (American Type Culture Collection): *Salmonella entérica subsp entérica serotipo paratyphi A* 630 ATCC 9150, *Salmonella entérica subsp entérica serotipo paratyphi B* 333 BIO UCV-13. *Salmonella entérica subsp entérica serotipo typhi* 495 CDC57, *Shigella sonnei* 635 ATCC 25931, *Shigella flexneri* 634 ATCC 29903, *Yersinia enterocolitica* 245 BIO UCV-4 y *Escherichia coli enterohemorrágica* (O157:H7 35150) obtenidas en el Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos (CVCM).

Preparación de las suspensiones bacterianas

Las cepas liofilizadas ATCC se prehidrataron en caldo BHI (infusión cerebro corazón) y se incubaron por 24 horas a 37 °C para su reproducción, tal como lo indica el CVCM. Luego se sembraron en agar sangre. Se seleccionaron colonias aisladas suspendiéndolas en caldo BHI hasta alcanzar la turbidez del patrón de 0,5 % Mc. Farland equivalente a 1.5 x 10⁸ UFC/mL. (10).

Para las diluciones se utilizó la técnica de macrodilución en tubo, con algunas adaptaciones, por tratarse de un producto natural diferente a los antibióticos comunes, realizada por Gil y cols en 2008 (17). Se procedió de la siguiente manera: Por cada bacteria usada se preparó una batería de once tubos de 150 x 20 correspondientes a 10 diluciones puntuales y al control de crecimiento, quedando así una concentración de tintura de propóleos desde el tubo 1 al 11 de 4, 8, 11, 15, 19, 23, 26, 30, 34, 37 % y 0 % respectivamente. Se utilizó un inóculo de 1,5 mL de la suspensión bacteriana (2,25 x 10⁸ UFC/mL) a cada tubo y se mezcló en varias ocasiones

durante su incubación a temperatura ambiente (25°C) por 24 horas (17).

Determinación de la actividad bacteriostática y bactericida

Trascurrido el tiempo de exposición de las bacterias con las distintas concentraciones de propóleos, se procedió a inocular 10 µL de cada tubo a placas de BHI, utilizando la técnica de siembra en superficie con espátula de Drigalski, así mismo de cada tubo de dilución se tomó con asa calibrada 10 µL y se inoculó en caldo BHI. En ambos procedimientos se incubó durante 24 a 48 horas a 37°C. Posteriormente, se observó si hubo o no crecimiento del microorganismo (17).

Evaluación de la actividad inhibitoria del etanol utilizado como solvente del propóleos

Este ensayo se realizó para establecer el efecto del etanol utilizado como solvente del propóleos 90% v/v sobre el crecimiento de los microorganismos.

Las concentraciones de etanol a utilizar se eligieron de acuerdo al porcentaje que alcanzó este vehículo al diluir la tintura de propóleos en cada tubo de caldo BHI, siendo las siguientes: (2, 3, 5, 7, 9, 10, 12, 14, 15, 17 y 0 %).

Determinación de la concentración mínima inhibitoria y bactericida del etanol

Se realizó la misma metodología empleada con la tintura de propóleos, obteniendo las siguientes concentraciones: 4, 9, 13, 18, 22, 26, 31, 35, 39, 44 y 0%.

Controles utilizados durante el desarrollo de la metodología

En cada ensayo se utilizó un control de viabilidad, el cual garantiza que el microorganismo es capaz de reproducirse en el agar y en el caldo BHI. Adicionalmente, en los tubos y en las placas donde se observó crecimiento bacteriano se realizó tinción de Gram, y las pruebas bioquímicas convencionales para su identificación, con la finalidad de confirmar si se trataba de las bacterias enteropatógenas utilizadas o de una posible contaminación. Cada procedimiento se realizó por duplicado, obteniéndose reproducibilidad de los resultados.

RESULTADOS

En la Tabla 1 puede observarse el efecto inhibitorio y bactericida sobre todas las bacterias estudiadas. *Salmonella paratyphi A* fue la única en la que se evidenció un efecto inhibitorio total en agar BHI y en el resto de las bacterias se evidenció efecto bacteriostático parcial. *Yersinia enterocolitica* fue la más sensible con una CMI 4% y CMB 8 %, seguida por *Shigella sonnei*, *Salmonella paratyphi B*, *Salmonella typhi* y *Escherichia coli* (O157:H7), con CMI 8% Y CMB 11 % y finalmente *Shigella flexneri* y *Salmonella paratyphi A* fueron las más resistente con CMI 11 % y CMB 15 %.

En las siete bacterias estudiadas se encontró un crecimiento abundante en los controles de viabilidad sin propóleos, lo que valida los resultados obtenidos

Tabla 1. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) de la tintura de propóleos sobre bacterias enteropatógenas.

Bacterias	CMI %	CMB %
<i>S. flexneri</i>	11	15
<i>S. sonnei</i>	8	11
<i>Y. enterocolitica</i>	4	8
<i>S. paratyphi A</i>	11	15
<i>S. paratyphi B</i>	8	11
<i>S. typhi</i>	8	11
<i>E. coli</i> (O 157 : H7)	8	11

En la tabla 2 se presentan los resultados de la evaluación de la actividad bacteriostática y bactericida de las concentraciones de etanol presentes en las distintas diluciones del propóleos. En este ensayo se utilizaron las bacterias *Yersinia enterocolitica* y *Shigella flexneri* como representantes del grupo de bacterias en esta investigación, por ser la más sensible y la más resistente respectivamente en la actividad bacteriostática y bactericida con el propóleos. En ellas se evidencian que hubo crecimiento en todas las diluciones.

Tabla 2. Evaluación de la actividad bacteriostática y bactericida de las concentraciones de etanol presentes en las distintas diluciones del propóleo.

Placas	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
% concentración	2	3	5	7	9	10	12	14	15	17	Sin etanol
Bacterias											
<i>S. flexneri</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Y. enterocolitica</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tubos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
% concentración	2	3	5	7	9	10	12	14	15	17	Sin etanol
Bacterias											
<i>S. flexneri</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Y. enterocolitica</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Lectura a las 24h/48h. + Indica desarrollo Bacteriano - Indica ausencia de desarrollo bacteriano.

En la Tabla 3 se muestra la concentración mínima inhibitoria y bactericida del etanol sobre las bacterias enteropatógenas obteniéndose que la CMI fue 18% y la CMB 20% en ambas bacterias, la cual es una concentración mayor que la encontrada en el último tubo de dilución de la evaluación de la actividad bacteriostática y bactericida de las concentraciones de etanol presentes en las distintas diluciones del propóleo,

(tubo 10, ver tabla 2) lo que confirma que el propóleo es quien ejerce la acción sobre las bacterias.

Tabla 3. Determinación de la concentración mínima bacteriostática y bactericida del etanol sobre las bacterias enteropatógenas.

Bacterias	CMI %	CMB %
<i>S. flexneri</i>	18	20
<i>Y. enterocolitica</i>	18	20

DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

Para entender los resultados se debe aclarar que se concibe por CMI el valor de la menor dilución que inhibió parcial o totalmente el desarrollo de las bacterias sobre el agar BHI, pero no así sobre caldo BHI; y por CMB el valor de la menor dilución en la que no se observa crecimiento de las bacterias en agar BHI y tampoco en caldo BHI. Este último procedimiento, con la finalidad de corroborar el efecto bactericida, ya que en algunas ocasiones los microorganismos pueden no crecer en agar BHI sólo porque están estresadas por la presencia de la sustancia inhibidora, pero al resembrarlas en caldo éstas se reproducen normalmente debido a que el factor inhibitorio está diluido (17).

De acuerdo con los resultados obtenidos, se puede analizar que el propóleo utilizado es de alta efectividad, ya que posee actividad bacteriostática y bactericida sobre bacterias Gram negativas, lo cual es un hallazgo importante debido a que tinturas de propóleos de otros países sólo son efectivos contra bacterias Gram positivas (1, 4, 5, 18).

Por otra parte, se encontró que la CMI y CMB alcanzadas en esta investigación fueron más elevadas que las de otros propóleos en el mundo, tal como lo demuestra el estudio de Sforcin y cols en 2000, (19) sobre la actividad antimicrobiana del propóleo, por el método de dilución en agar, abarcando un rango de concentraciones de 0,4 a 14,0 % (v/v), en donde demostraron que el propóleo inhibe las bacterias Gram positivas a bajas concentraciones (0,4%) y que las bacterias Gram negativas son menos susceptibles con mayores CMI que oscilan entre 4,5 a 8,0 %. Los autores concluyen que el propóleo de Brasil posee una mayor actividad sobre las bacterias Gram positivas y una apreciable efectividad sobre las bacterias Gram negativas en comparación con el propóleo utilizado en esta investigación, cuyo rango fue de 8 % a 15 %.

El presente estudio demuestra que la actividad bacteriostática y bactericida ejercida por la tintura de propóleos sobre las bacterias enteropatógenas evaluadas son similares entre sí, debido a que *S. sonnei*, *S. paratyphi B*, *S. typhi* y *E. coli* (O 157:H7) obtuvieron los mismos resultados. Este hallazgo es comparable con los resultados obtenidos por Gil y cols en 2008 (17) los cuales trabajaron con una tintura de propóleos de Tinaquillo Edo. Cojedes, Venezuela sobre siete bacterias de interés clínico entre las que se encuentran dos bacilos aerobios entéricos (*Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae*) en donde el resultado obtenido en la determinación de la CMB sobre estas dos bacterias fue igual al conseguido en

esta investigación (ver Tabla 1); y aunque la fabricación de las tinturas de propóleos provienen de la misma zona geográfica, cabe destacar que se elaboraron en apiarios diferentes. Esto sugiere que podría establecerse rangos de efectividad por géneros bacterianos de acuerdo a la zona geográfica en la que se produce el producto, siendo una guía para futuros tratamientos.

En otro estudio realizado por Erkmen y Ozcan en 2008 (20) se observó que una concentración de 0,02 % a 2,5 % (v / v), de propóleos turco sobre *Escherichia coli* y *Salmonella typhi* fue ineficaz. Este trabajo coincide con estos resultados ya que el propóleo utilizado necesitó concentraciones más altas para ser efectivo con una CMB de 11 % para las bacterias mencionadas. Sin embargo, Ugur y Arslan en 2004 (21) realizaron un estudio *in vitro* sobre la actividad antimicrobiana de los propóleos de la provincia de Mugla de Turquía, en donde obtuvieron como resultado que el microorganismo más sensible a los propóleos fue *Shigella sonnei* en el grupo de bacterias Gram negativas, lo cual difiere de los resultados de la presente investigación, ya que la bacteria más sensible fue *Yersinia enterocolitica*. Esto posiblemente pueda deberse a la composición química de ambos propóleos debido a que provienen de zonas geográficas diferentes. Sin embargo, cabe destacar que con ambos propóleos hubo efectividad.

En el presente estudio, se demostró que el etanol utilizado como solvente del propóleo en crudo no es el responsable de la actividad bacteriostática ni bactericida sobre las bacterias enteropatógenas, debido a que se encontró que la CMI y la CMB del etanol son más elevadas que las alcanzadas en las diluciones del propóleo; además, para que este solvente pueda tener algún efecto se necesitan concentraciones más altas (ver Tabla 3). Con ello se aclara que el etanol es sólo utilizado como un solvente de esta resina y no como coadyuvante y, aunque está demostrado que los extractos etanólicos de propóleos son más efectivos que las acuosas (22), es razonable que esto se deba a que el propóleo es poco soluble en agua.

En este estudio también se evidenció que *E. coli* O157:H7, a pesar de ser más patógena que *Shigella flexneri*, muestra ser más sensible *in vitro* a la tintura de propóleos. Esto representa un dato importante, ya que *E. coli* O157:H7 no posee tratamiento farmacológico eficaz, sin efectos adversos (23).

Debido a la importancia que poseen las enterobacterias en los síndromes diarreicos agudos (24), es de vital importancia demostrar que la tintura de propóleos pueda ser una nueva alternativa en su tratamiento, con un producto natural al cual no se le ha demostrado resistencia hoy en día y cuya única contraindicación hasta ahora es que el paciente sea alérgico a los productos apícolas. (25)

Finalmente, de acuerdo con los resultados de la investigación del estudio *in vitro*, se concluye que el propóleo puede ser utilizado como un agente antimicrobiano contra las bacterias enteropatógenas, coincidiendo con lo que afirman otros autores, que la tintura de propóleos puede ser utilizado como un excelente antimicrobiano (15, 17, 26, 27).

Agradecimientos

Los autores agradecen al Profesor Tomás Rojas y al Profesor Germán González de la Universidad de Carabobo, Valencia por sus valiosas asesorías e incondicional apoyo y al personal Administrativo y Obrero del Departamento de Microbiología de la misma Casa de Estudios por el soporte técnico.

REFERENCIAS

- Manrique A, Santana W. Flavonoides, actividades antibacteriana y antioxidante de propóleos de abejas sin aguijón, *Melipona quadrifasciata*, *Melipona compressipes*, *Tetragonisca angustula* y *Nannotrigona* sp. de Brasil y Venezuela. *Zootecnia Trop*. 2008; 26 (2):157-166.
- Peña R. Estandarización en propóleos: antecedentes químicos y biológicos. *Cienc Inv Agr*. 2008; 35(1):17-26.
- Chaillou L, Herrera H, Maidana J. Estudio del propóleos de Santiago del Estero, Argentina. *Cienc Tecnol Aliment*. 2004; 24 (1):11-15.
- Marcucci M, Ferreres F, García-Viguera C, Bankova V, De Castro S, Dantas A. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *J Ethnopharmacol*. 2001; 74 (2):105-112.
- Farré R, Frasquet I, Sánchez A. El própolis y la salud. *Ars Pharmaceutica*. 2004; 45 (1): 21-43.
- Reyes H, Navarro P, Reyes Barrios H. Resistencia bacteriana a los antimicrobianos. *Antibiót e Infec*. 1998; 6 (2): 12-19.
- Sader H. Resistencia antimicrobiana en Latinoamérica: ¿Cómo estamos? *Rev Chil Infectol*. 2002; 19 (1): 5-13.
- Gómez A. La resistencia bacteriana...es un problema de salud. *Rev. Salud Integra*. 2009; 8(49):54.
- González M, González N. Familia *Enterobacteriaceae* (XXI) Enterobacterias En: Manual de Microbiología Médica (2da ed.) Valencia - Venezuela: Producción Editorial Universidad de Carabobo; 2011. p177-189.
- Koneman E, Allen S, Janda W, Schreckenberger P, Winn W. Diagnóstico Microbiológico. (6ta ed.). Argentina, Editorial Panamericana S.A; 2008. p.196-206.
- Organización Mundial de la Salud. Estadísticas Sanitarias Mundiales 2010. Disponible en http://www.who.int/whosis/whostat/ES_WHS10_Full.pdf. Consultado el 15 de septiembre de 2011.
- Rincón G, Ginestre M, Harris B, Romero S y Martínez A. Frecuencia de bacterias enteropatógenas en niños menores de cinco años. *Kasmera*. 2002; 30(1): 33-41.
- Ministerio del Poder Popular para la Salud (MPPS). Anuario de Mortalidad 2008. Caracas, Dirección General de Epidemiología, 2008; 256:1-384.
- Burdock G. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food Chem Toxicol*. 1998; 36(4):347-363.
- Quintana T, Lugones M, González E y Rodríguez T. Comparación de dos tratamientos: propóleos y lugol, en pacientes con cervicitis aguda. *Rev Cubana Med Gen Integr*. 1996; 12(3):255-263.
- Manrique, A. Actividad antimicrobiana de propóleos provenientes de dos zonas climáticas del estado Miranda, Venezuela. Efecto de la variación estacional. *Zoot Trop*. 2006; 24 (1):43-53.
- Gil M, Reyes D, Rojas T, Flores M. Actividad bacteriostática y bactericida de una tintura de propóleos proveniente del Estado Cojedes sobre bacterias de interés clínico. *Bol Venez de Infectol*. 2008; 19 (2): 124.
- Uzel A, Sorkun K, Onçağ O, Cogulu D, Gençay O, Salih B. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. *Microbiol Res*. 2005; 160(2):189-95.
- Sforzin J, Fernandes A, Lopes C, Bankova V y Funari S. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. *J Ethnopharm*. 2000; 73: 243-249.
- Erkmen O, Ozcan M. Antimicrobial effects of Turkish propolis, pollen, and laurel on spoilage and pathogenic food-related microorganisms. *J Med Food*. 2008; 11(3):587-92.
- Ugur A, Arslan T. An in vitro study on antimicrobial activity of propolis from Mugla province of Turkey. *J Med Food*. 2004; 7(1):90-94.
- Tolosa L, Cañizares E. Obtención, caracterización y evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos de Campeche. *Ars Pharmaceutica*. 2002; 43:1-2; 187-204.
- Wolff R. Consecuencias adversas inesperadas durante el uso de antimicrobianos: Cuando el tratamiento puede ser peligroso para la salud. *Rev Chil Infectol*. 2002; 19 (1): 56-61.
- Síndrome diarreico agudo: Recomendaciones para el diagnóstico microbiológico. *Rev Chil Infectol*. 2002; 19(2): 101-113.
- Neacato S. Uso de extractos etanólicos de propóleos para el control de *Staphylococcus aureus* in vitro obtenidos de leche de vacas con mastitis. Facultad de Ingeniería de Ciencias Agropecuarias. ESPE-IASA I. Sede El Prado (2005). Disponible en: <http://repositorio.espe.edu.ec/handle/21000/2593> <http://repositorio.espe.edu.ec/handle/21000/2593>. Consultado el 05 de mayo de 2012.
- Ugur A, Barlas M, Ceyhan N, Turkmen V. Antimicrobial effects of propolis extracts on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* strains resistant to various antibiotics and some microorganisms. *J Med Food*. 2000; 3(4):173-80.
- Berretta A, Nascimento A, Bueno P, Marchetti J. Propolis Standardized Extract (EPP-AF®), an Innovative Chemically and Biologically Reproducible Pharmaceutical Compound for Treating Wounds. *Int J Biol Sci*. 2012; 8(4): 512-521.