



## **ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO**

### **EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIBIÓTICO IN-VITRO DEL EXTRACTO HIDRO-ALCOHÓLICO DE PROPÓLEO DE ABEJAS (EHAPA) SOBRE BACTERIAS ATCC CAUSANTES DE METRITIS BOVINA**

**LEIDY AMARILIS ALBAN MORETA**

**Trabajo de Titulación modalidad Proyectos de Investigación y Desarrollo, presentado  
ante el Instituto de Posgrado y Educación Continua de la ESPOCH, como requisito  
parcial para la obtención del grado de:**

**MAGÍSTER EN REPRODUCCIÓN ANIMAL  
MENCIÓN REPRODUCCIÓN BOVINA.**

**Riobamba – Ecuador**

**Noviembre – 2022**

. © 2022, Leidy Amarilis Alban Moreta

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo cita bibliográfica del documento, siempre y cuando se reconozca el Derecho de Autor



## ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE CHIMBORAZO

### CERTIFICACIÓN

EL TRIBUNAL DE TRABAJO DE TITULACIÓN CERTIFICA QUE:

El **Trabajo de Titulación Modalidad Proyectos de Investigación y Desarrollo**, titulado **EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIBIÓTICO IN-VITRO DEL EXTRACTO HIDRO-ALCOHÓLICO DE PROPÓLEO DE ABEJAS (EHAPA) SOBRE BACTERIAS ATCC CAUSANTES DE METRITIS BOVINA**, de responsabilidad de la Señorita LEIDY AMARILIS ALBAN MORETA, ha sido prolijamente revisado y se autoriza su presentación.

Tribunal:

Ing. Luis Eduardo Hidalgo Almeida; Ph. D.  
**PRESIDENTE**

Ing. Fredy Bladimir Proaño Ortiz; Ph. D.  
**DIRECTOR**

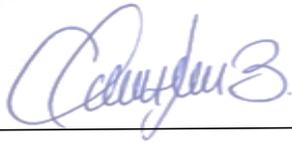
Ing. Byron Leoncio Díaz Monroy; Ph. D.  
**MIEMBRO**

Ing. José Vicente Trujillo Villacís; M. Sc.  
**MIEMBRO**

Riobamba, noviembre 2022

## DERECHOS INTELECTUALES

Yo, Leidy Amarilis Alban Moreta, soy responsable de las ideas, doctrinas y resultados expuestos en este **Trabajo de Titulación modalidad Proyectos de Investigación y Desarrollo**, y que el patrimonio intelectual generado por la misma pertenece exclusivamente a la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.



---

Leidy Amarilis Alban Moreta

**C.I. 120671670-4**

## **DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD**

Yo, Leidy Amarilis Alban Moreta, declaro que el presente Trabajo de Titulación modalidad proyectos de investigación y desarrollo, es de mi autoría y que los resultados del mismo proyecto son auténticos y originales los textos constan en el documento que provienen de otra fuente están debidamente citados y referenciados.

Como autora asumo la responsabilidad legal y académica de los contenidos de este proyecto de investigación de maestría.



---

Leidy Amarilis Alban Moreta

**C.I. 120671670-4**

## DEDICATORIA

A DIOS quien me dio fortaleza en momentos difíciles, además por llenarme de sabiduría, cuando lo necesite.

Con todo mi cariño y amor a mi Madre Norma Moreta quien desde el cielo fue mi luz y mi guía, a mi Abueli Carmen López quien con sus consejos y mimos nunca me dejo sola, a mi Padre Guido Albán, a mi Hermano Romario Albán, a mis Tíos maternos quienes han sido un pilar fundamental en mi desarrollo profesional, personas a las cual amo con el corazón son ahora quienes forman parte de este sueño hecho realidad, a ustedes por siempre mi corazón y mi agradecimiento.

Y de manera muy especial al Ingeniero William Fabricio Barzola Ocampo, por animarme día tras día, por escuchame y brindarme su apoyo incondicional, gracias infinitas.

A mis profesores, gracias por su tiempo, por su apoyo, así como también por la sabiduría que me trasmitieron en el desarrollo de mi formación profesional.

*Leidy Amarilis Albán Moreta*

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Instituto de Posgrado y Formación Continua, a la Facultad de Ciencias Pecuarias por darme la apertura para realizar mi investigación en sus diferentes laboratorios, siendo así partícipes de este proceso permitiéndome formarme profesionalmente y llegar a este momento decisivo de mi vida profesional.

Un agradecimiento especial al Ing. Fredy Bladimir Proaño Ortiz; Ph. D., Director de Tesis, quien con buena voluntad y amplio conocimiento permitió la ejecución y culminación de la presente investigación.

Al Ing. Byron Leoncio Díaz Monroy; Ph. D., en calidad de Asesor de Tesis por su apoyo constante, dedicación y paciencia; por enseñarme que los pequeños detalles también cuentan en este arduo proceso.

Al Ing. José Vicente Trujillo Villacís; M.sc., en calidad de Asesor de Tesis por su desinteresada colaboración, por ser guía en mi crecimiento profesional desde el pregrado y ahora ayudarme a hacer posible la culminación de este Posgrado.

Por último y no menos importante por último a mis amigos y amigas quienes indistintamente fueron parte de mi formación como profesional gracias por el granito de arena aportado, que hizo posible mis sueños.

## CONTENIDO

<b>RESUMEN</b> .....	xiv
<b>ABSTRACT</b> .....	xv
<b>CAPÍTULO I</b> .....	1
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1.1. Planteamiento del problema .....	3
1.1.1. Situación del problema.....	3
1.1.2. Formulación del problema.....	3
1.2. Justificación de la investigación.....	4
1.3. Objetivos .....	5
1.3.1. General .....	5
1.3.2. Específicos.....	5
1.4. Hipótesis .....	5
1.5. Identificación de variables.....	5
1.5.1. Variable Independiente: .....	5
1.5.2. Variables dependientes.....	5
<b>CAPÍTULO II</b> .....	7
<b>MARCO DE REFERENCIA</b> .....	7
2. 1. Etiología de las infecciones uterinas .....	7
2.1.1 Endometritis .....	7
2.1.2 Piometra.....	8
2.1.3 Metritis .....	8
2. 2. Microbiota normal del útero.....	9
2.2.1. En vacas clínicamente sanas.....	10
2.2.2. En la gestación y en el puerperio.....	10
2.2.3. En vacas infecundas .....	10
2. 3. Mecanismos de defensa del útero.....	11

2. 4.	Tratamiento de las infecciones uterinas .....	12
2. 5.	Resistencia bacteriana .....	13
2. 6.	Generalidades de las cepas de bacterias .....	13
2. 7.	Bacterias ACCT® .....	14
2.7.1.	Staphylococcus aureus. ....	14
2.7.2.	Escherichia coli .....	15
2. 8.	Medios de cultivo y recuentos de microorganismos. ....	16
2.8.1.	Técnica de recuentos de microorganismos.....	17
2. 9.	Antibiograma.....	17
2. 10.	Propóleos .....	18
2.10.1.	Origen del propóleos .....	18
2.10.2.	Características de los propóleos .....	18
2.10.3.	Mecanismo de Acción del Propóleos .....	19
2. 11.	Estudios sobre el extracto Hidro-alcohólico del propóleo .....	20
 <b>CAPÍTULO III</b> .....		<b>21</b>
 <b>METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN</b> .....		<b>21</b>
3.1.	Localización y duración del experimento .....	21
3.2.	Unidades experimentales.....	21
3.3.	Materiales, equipos, e instalaciones .....	22
3.3.1.	Materiales .....	22
3.3.2.	Equipos.....	24
3.3.3.	Insumos .....	25
3.3.4.	Instalaciones .....	26
3.4.	Tipo de investigación .....	27
3.5.	Método de investigación .....	27
3.6.	Tratamientos y diseño experimental.....	27
3.7.	Análisis estadísticos y prueba de significancia .....	28
3.8.	Mediciones experimentales .....	29
3.9.	Procedimiento experimental.....	29
3.9.1.	Elaboración de EHAPA (Extracto Hidro-alcohólico de Propóleos de Abejas) .....	30

3.9.2.	Análisis de Fenoles totales expresados como Ácido Gálico .....	31
3.9.3.	Investigación de laboratorio .....	31
<b>CAPÍTULO IV</b> .....		<b>33</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....		<b>33</b>
4.1.	Fenoles totales .....	33
4.2.	Eficacia curativa de EHAPA en bacterias ATCC®. ....	34
4.3.	Evaluación de sensibilidad de bacterias ATCC® con EHAPA frente a antibióticos comerciales .....	38
4.4.	Proyección de Costo de Producción.....	41
<b>CONCLUSIONES</b> .....		<b>42</b>
<b>RECOMENDACIONES</b> .....		<b>42</b>
<b>GLOSARIO</b>		
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>		
<b>ANEXOS</b>		

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2-1. Criterio de interpretación de antibiograma .....	18
Tabla 3-1. Condiciones meteorológicas del cantón Riobamba. ....	21
Tabla 3-2. Esquema del experimento, bacterias <i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>Aureus</i> .....	28
Tabla 3-3. Esquema del experimento, bacterias <i>Escherichia coli</i> .....	28
Tabla 3-4. Esquema del ANOVA, Bacterias <i>S. aureus</i> .....	29
Tabla 3-5. Esquema del ANOVA, Bacterias <i>E. coli</i> .....	29
Tabla 4-1. Análisis de Fenoles totales expresados como Ácido Gálico del Extracto Hidroalcohólico de Propóleos de Abejas.....	33
Tabla 4-2. Número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC. ml-1) en <i>S. aureus</i> y <i>E. coli</i> ATCC® por efecto de EHAPA .....	35
Tabla 4-3. Sensibilidad In vitro en <i>S. aureus</i> y <i>E. coli</i> ATCC® por efecto de EHAPA y antibióticos comerciales. ....	39
Tabla 4-4. Proyección de costo del Extracto Hidroalcohólico de propóleos de abejas .....	41

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 4-1	Análisis de regresión entre las Unidades Formadoras de colonias y el nivel de EHAPA sobre <i>Staphylococcus aureus</i> .....	37
Gráfico 4-2	Análisis de regresión entre las Unidades Formadoras de colonias y niveles de EHAPA sobre <i>Escherichia coli</i> .....	38

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo A: Rendimientos de 3 réplicas de Extracto Hidro-alcohólico de propóleo de Abeja

Anexo B: Halo de inhibición de antibióticos en *Staphylococcus aureus*

Anexo C: Halo de inhibición de antibióticos en *Escherichia coli*

Anexo D: Nivel de eficacia curativa de EHAPA en *Staphylococcus aureus*

Anexo E: Nivel de eficacia curativa de EHAPA en *Escherichia coli*

Anexo F: Proceso de Elaboración del Extracto Hidro-alcohólico de Propóleos de Abeja

Anexo G: Preparación de medios de cultivo y dilución de bacterias *S. aureus* y *E. coli*

Anexo H: Inoculación de Bacterias y aplicación de antibióticos comerciales

Anexo I: Inoculación de Bacterias y aplicación de EHAPA

## RESUMEN

El objetivo fue evaluar el efecto antibiótico *in-vitro* del Extractor Hidro-Alcohólico de Propóleos Apícolas (EHAPA) sobre bacterias ATCC® causantes de metritis bovina, se utilizaron dos tipos de bacterias *Staphylococcus aureus subsp. Aureus* y *Escherichia coli*, divididas en cinco tratamientos: T0= tratamiento testigo; T1= (15%) EHAPA; T2= (30%) EHAPA; T3= (45%) EHAPA; T4= (60%) EHAPA; con 3 repeticiones por cada tratamiento. Además, se incluyeron dos tratamientos para antibióticos comerciales para medir Sensibilidad: T5= Oxi-Tetraciclina® y T6= Penicilina®. Se aplicó un Diseño Completamente al Azar y las medias se separaron mediante prueba de Duncan ( $p \leq 0,05$  y  $p \leq 0,01$ ); se aplicó análisis de correlación de Pearson para las variables estudiadas, utilizando INFOSTAT versión 2019. En la extracción de los principios activos del propóleos de abeja, se logró encontrar que el efecto antibiótico del extracto alcohólico se debe a su principal principio activo de EHAPA que son los fenoles parciales que al combinarse se obtuvo 39,51 mg/ml. Se encontró una mejor respuesta antibacteriana con concentración de 60% dando resultados de inhibición bacteriana similares en *Staphylococcus aureus* como en *Escherichia coli*, demostrando que a medida que se incrementa la concentración disminuye la carga bacteriana. En cuanto a la sensibilidad su mayor acción se presentó al 45 % y 60%, presentando una Concentración Mínima Inhibitoria mayor al 80%, difiriendo así de los antibióticos comerciales quienes presentaron niveles de sensibilidad diferente. Es posible suponer una superioridad debido a que no se encontraron niveles de resistencia, concluyendo así que el uso de este tipo de extracto en estas condiciones presenta excelentes resultados.

**Palabras clave:** EXTRACTO DE PROPOLEOS, EXTRACTOR HIDRO-ALCOHÓLICO DE PROPOLEOS APÍCOLAS (EHAPA), BACTERIAS, METRITIS, SENSIBILIDAD.



Firmado electrónicamente por:

LUIS ALBERTO CAMINOS VARGAS



26-09-2022

0132-DBRA-UPT-IPEC-2022

## ABSTRACT

The Aim was to evaluate the in-vitro antibiotic effect of Apicultural Propolis Hydro-Alcoholic Extractor (EHAPA) on ATCC® bacteria causing bovine metritis, using two types of bacteria *Staphylococcus aureus* subsp. *Aureus* and *Escherichia coli*, divided into five treatments: T0= control treatment; T1= (15%) EHAPA; T2= (30%) EHAPA; T3= (45%) EHAPA; T4= (60%) EHAPA; with 3 repetitions for each treatment. In addition, two treatments for commercial antibiotics were included to measure Sensitivity: T5= Oxy-Tetracycline® and T6= Penicillin®. A Completely Randomised Design was applied and means were separated by Duncan's test ( $p \leq 0.05$  and  $p \leq 0.01$ ); Pearson's correlation analysis was applied for the variables studied, using INFOSTAT version 2019. In the extraction of the active principles of bee propolis, it was found that the antibiotic effect of the alcoholic extract is due to its main active principle of EHAPA, which are the partial phenols that when combined, 39.51 mg/ml were obtained. A better antibacterial response was found with a concentration of 60%, giving similar bacterial inhibition results in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, demonstrating that as the concentration increases, the bacterial load decreases. In terms of sensitivity, its greatest action was presented at 45% and 60%, presenting a Minimum Inhibitory Concentration greater than 80%, thus differing from commercial antibiotics which presented different levels of sensitivity. It is possible to assume a superiority due to the fact that no resistance levels were found, thus concluding that the use this type of extract under these conditions presents excellent results.

Keywords: PROPOLIS EXTRACT, HYDRO-ALCOHOLIC PROPOLIS EXTRACTOR (HPAE), BACTERIA, METRITIS, SENSITIVITY.

# CAPÍTULO I

## 1. INTRODUCCIÓN

Sánchez et. al. (2017), reporta que la metritis, es una inflamación causada por microorganismos patógenos en las paredes musculares del útero y del endometrio. La metritis puede presentarse en el momento del parto, debido a que el cérvix se abre antes, durante y después del parto, lo que permite una contaminación del útero como lo mencionan (López, 2015). La etiología de la enfermedad es multifactorial y generalmente la flora bacteriana es mixta, incluyendo microorganismos tales como enterobacterias (*Escherichia coli* y *Escherichia Proteus*), cocos Gram positivos del género (*Staphylococcus* y *Streptococcus*), *Actinomyces* y *Pseudomonas*, (Roberts, 1986; Galetto y Martín, 1994; Lewis, 1997) citado por (Cayul, 2003).

En efecto Borie et al. (2004) manifiesta que la metritis es un complejo sanitario multifactorial, siendo las bacterias, la causa determinante de la enfermedad, las cuales han desarrollado una elevada resistencia a los antibióticos de uso habitual utilizados para su tratamiento. Los expertos citados llegaron a la conclusión señalada, sobre la base de un estudio de sensibilidad microbiana realizado por el método de Kirby-Bauer concluyeron, que un tratamiento inadecuado podría provocar pérdidas económicas.

También se ha reportado que es habitual el uso de antibióticos de amplio espectro en el tratamiento de metritis, lo que ha permitido la aparición de cepas bacterianas resistentes (Cruz, 2009). El tratamiento de la metritis se basa en la utilización de una diversidad de antibióticos, aplicados por vía parenteral y local; sin embargo, también se ha usado la terapia hormonal a base de estrógenos, prostaglandinas y gonadotropina (Fernández, Silveira y López, 2006).

La eficiencia y eficacia de los tratamientos aplicados para el tratamiento curativo de la metritis bovina hasta el momento, muestran una efectividad muy variable, compleja y a veces poco efectiva, por lo que es necesario buscar nuevas alternativas de tratamiento contra esta patología, que permita lograr efectividad y eficacia antibacteriana alta, poco variable, y sobre todo, que no cause resistencia de las bacterias ante el producto utilizado; esto podría ser posible al combinar un efecto antibacteriano y al mismo tiempo un incremento en los factores de

inmunidad animal. Todo esto podría ser posible con una adecuada utilización del propóleo apícola.

El propóleo es una sustancia resinosa producida por las abejas melíferas (*Apis mellifera L.*), a partir de las yemas y cortezas (exudados de savia) de los árboles (Shahbaz et al., 2015 y Salmón, 2014). El propóleo de las abejas es una rica fuente de polifenoles (flavonoides, ácidos fenólicos y sus ésteres); se sabe que los flavonoides son los principales compuestos químicos, presentes en el propóleo apícola y otras sustancias fundamentalmente vegetales, a los que se les atribuye como responsables de una actividad bactericida; este efecto se produciría al reducir la actividad enzimática de las bacterias, lo que inhibe su crecimiento (Muñoz, Linares y Narvaez, 2011).

El propóleo apícola tiene una composición compleja a la cual se le adjudica una capacidad antibacteriana, antimicótica y antiviral (Noriega, 2014); esta actividad ha sido estudiada sin llegar a resultados concluyentes, sin embargo, se ha demostrado que el propóleo desorganiza el citoplasma bacteriano, la membrana citoplasmática y la pared celular dándonos como resultado una bacteriólisis parcial que inhibe la síntesis proteica (Calvo, 2009).

Tanto las bacterias Gram positivas como las Gram negativas son susceptibles al propóleo (Zeighampour et al., 2013). El propóleo puede retrasar el desarrollo de la formación de biopelículas patógenas de microorganismos bacterianos, incluidas las especies de *Listeria spp.*, *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus (S.) spp.*, *Bacillus (B.) spp.*, *Escherichia (E.) coli* y *Pseudomonas* (Stan et al., 2013).

En ese mismo contexto (Fernández et al., 2005). Manifiesta que la composición química del propóleo y su amplio espectro de actividades biológicas han llamado la atención de los investigadores; Múltiples estudios bacteriológicos in-vitro, han confirmado la acción bacteriostática y bactericida que se le atribuye al propóleo como lo menciona (Ortega, 2011), citando a varios autores; Fernández et al., 2005; Martínez, 2003; Vargas, 2004; Tolosa, 2005y Orsi et al., 2008.

El propósito de esta investigación fue el de evaluar el efecto antibiótico del Extracto Hidro-alcohólico de Propóleo de Abejas (EHAPA), a nivel de laboratorio (*in-vitro*), tomando

como referencia bacterias (ATCC®) de tipo Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*) y Gram-negativas (*Escherichia Coli*) causantes de Metritis en vacas, las cuales son más representativas en este tipo de patologías.

## **1.1. Planteamiento del problema**

### **1.1.1. Situación del problema**

Las afecciones del tracto reproductivo bovino conocidas como metritis, provocan una inflamación e infección del útero y son una de las principales causas de infertilidad, tienen una incidencia del 5 al 35 %, ocasionando pérdidas económicas importantes a corto y largo plazo (Galarza, 2013).

Las empresas farmacéuticas ofrecen diferentes productos para tratar la metritis bovina; estos son conocidos como antibióticos específicos y de amplio espectro, tratamientos hormonales (basados en estrógenos, prostaglandinas y gonadotropina) o la combinación de estos dos (Galarza, 2013).

La situación problemática se debe a la aparición del fenómeno conocido como “resistencia antimicrobiana” ha hecho que el tratamiento no presente la misma eficacia y efectividad lo que provoca el apareamiento de nuevas cepas de bacterias multirresistentes.

### **1.1.2. Formulación del problema**

Actualmente en el Ecuador existe un uso indiscriminado de antibióticos y hormonas frente a la presencia de metritis en vacas, esto se debe al desconocimiento del manejo adecuado de esta afección.

Proaño *et al.* (2016) desarrollaron un procedimiento de laboratorio que permitió la obtención de extractos hídrico y alcohólico de propóleos apícolas, extracto al que denominaron “extracto hidroalcohólico de propóleos apícola” al que lo identificaron como EHAPA, por sus siglas; por otro lado, realizaron los primeros estudios de su efectividad en el Ecuador y propusieron su utilización en el tratamiento de metritis bovina, basados en ensayos preliminares conducidos para el efecto; finalmente recomendaron profundizar el estudio, de tal modo que, se puedan lograr resultados más concluyentes.

Las dudas científicas a las que arribamos del estudio citado por Proaño *et al.* (2016), se resumen en las siguientes:

- a. ¿Cómo tratar técnicamente el propóleo apícola en bruto?
- b. ¿Cuáles son los principales principios activos antibacterianos que son posibles de encontrar en el propóleo?
- c. ¿El propóleo contiene principios activos antibacterianos que son hidrosolubles?
- d. ¿El propóleo contiene principios activos antibacterianos que son solubles en alcohol?
- e. ¿El poder antibiótico de los principios activos hidrosolubles y solubles en alcohol pueden químicamente ligarse?
- f. ¿EHAPA puede ser realmente un producto antibacteriano?

Las respuestas a estas incógnitas son las que desarrollamos en el presente estudio.

## **1.2. Justificación de la investigación**

En líneas generales el uso indiscriminado y prolongado de antimicrobianos se traduce en grandes cantidades de antibiótico liberadas al medio ambiente volviendo a un sinnúmero de agentes patógenos multirresistentes, la importancia del presente estudio radica en reconocer compuestos de origen natural que no posean efectos secundarios o colaterales, como el propóleo, al cual se le atribuye la acción bactericida permitiendo obtener los resultados servirán como aporte en la utilización de un tratamiento alternativo para metritis en vacas, de forma eficaz y económica.

Considerando que no se ha profundizado en estudios que establezcan resultados sobre las incógnitas planteadas anteriormente en la presente investigación se estudió el manejo técnico de propóleo apícola, como el principal principio activo y solubilidad del mismo, en este mismo contexto su efecto antibiótico, concentración y eficacia curativa in-vitro en bacterias ATCC® (*Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*) causantes de metritis bovina del Extracto Hidro-alcohólico de propóleo apícola (EHAPA).

### **1.3. Objetivos**

#### **1.3.1. General**

Evaluar el efecto antibiótico *in-vitro* del Extractor Hidro-alcohólico de Propóleo de Abejas (EHAPA) sobre bacterias ATCC<sup>®</sup> causantes de metritis bovina.

#### **1.3.2. Específicos**

- Elaborar el Extracto Hidro-alcohólico, (EHAPA) mediante la utilización de propóleos de abeja.
- Identificar el principal principio activo de Propóleos y su solubilidad.
- Valorar la eficacia curativa In vitro del Extracto Hidro-alcohólico de Propóleo de Abeja (EHAPA) en *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*.
- Determinar la sensibilidad In vitro de bacterias (*Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*) ante el Extracto Hidro-alcohólico de Propóleos de Abeja (EHAPA) frente a antibióticos tradicionales.

### **1.4. Hipótesis**

Existe un efecto antibiótico del Extracto Hidro-alcohólico de propóleos apícola, al utilizarlo In vitro contra bacterias ATCC<sup>®</sup> (*Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*), causantes de metritis en vacas.

### **1.5. Identificación de variables**

#### **1.5.1. Variable Independiente:**

Concentración de 0%, 15%, 30%, 45% y 60 % de EHAPA

Tratamiento control, con Discos de antibióticos comerciales (Oxi-Tetraciclina<sup>®</sup> y Penicilina<sup>®</sup>), para Sensibilidad.

#### **1.5.2. Variables dependientes**

Nivel de solubilidad del principio activo principal en alcohol potable y agua destilada.

Niveles de sensibilidad en bacterias ATCC® (*Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*) frente al antibiótico comercial y EHAPA.

Nivel de eficacia curativa del EHAPA In vitro en bacterias ATCC® (*Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*).

## CAPÍTULO II

### 2. MARCO DE REFERENCIA

#### 2.1. Etiología de las infecciones uterinas

Una de las patologías más importantes del ganado lechero son las relacionadas a infecciones uterinas (Dhaliwal *et ál.*, 2001), son más frecuentes en el ganado lechero que en el de carne, asociadas generalmente a infecciones bacterianas que se favorecen cuando concurren diferentes factores predisponentes relacionados con la higiene, el tipo de parto, la atención al parto como lo menciona (Fernández *et ál.*, 2006) citando a Brito 1992; Hussain, 1991; Valencia 1991; Borsberry 1997, son factores predisponentes para la aparición de estas patologías (Dhaliwal *et ál.*, 2001).

Las infecciones del útero pueden clasificarse en tres diferentes síndromes clínicos: endometritis, metritis y piometra (Fernández, A. 2006).

##### 2.1.1 *Endometritis*

La endometritis se define como la inflamación de la capa glandular del útero o endometrio, debido a la acción de diferentes microorganismos a través de sus toxinas u otros factores (Martínez *et ál.*, 2006). La endometritis como tal, cubre la inflamación del endometrio en los casos de infecciones muy leves, en que solo se afecta el endometrio (Brito, 1992; Valencia, 1991; Threlfall, 1986; Hafez, 1993; Murray, 1997 y Lech, 1998) citados por Martínez *et al.*, 2006.

Este proceso es caracterizado por cambios degenerativos en el epitelio superficial, congestión vascular con edema en el estroma y migración de neutrófilos y otras células inflamatorias al área afectada (Montenegro, 2015) cita a (Foldiet, *et ál.*, 2006). Los problemas localizados en el aparato reproductor se visibilizan en la expulsión de pequeñas cantidades de exudado seroso, seroso purulento o moco purulento, hasta volverse más abundante y purulento según (Martínez *et ál.*, 2006) quien cita a Sheldon, 1997 y Brito *et al.*, 2001; Otros síntomas que se podrían presentar son pirexia, reducción del apetito y reducción de la producción de leche

además otra forma de diagnosticar esta patología es con la palpación rectal donde se puede notar un incremento del tamaño y grosor del útero (Martínez *et al.*, 2006).

En tal sentido, histológicamente la endometritis se describe como la rotura del epitelio superficial, infiltración con células inflamatorias, congestión vascular, edema del estroma y por varios grados de acumulación de linfocitos y células plasmáticas en la capa superficial del endometrio adicional (Martínez *et al.*, 2006) citando a De Bois CHW, (1986).

### **2.1.2 Piometra**

La piometra se define como la acumulación de exudado purulento en el lumen uterino, seguido de retención del cuerpo lúteo y desaparición de los signos de celo. (Martínez *et al.*, 2006). Pues la mayoría de las veces, la piometra se presenta como secuela de la endometritis ya que, cuando las vacas con este problema ovulan, desarrollan este cuadro, por esta razón es detectada casi exclusivamente en vacas con un cuerpo lúteo activo, a partir de los 21 días posparto (Foldiet *et ál.*, 2006) citado por Montenegro, 2015.

Como resultado esto se debe a que el endometrio se altera seriamente, y si no se realiza un tratamiento oportuno, se forma una zona de fibrosis amplia que causa problemas de infertilidad, (Herrera, 2013) Al examinar el animal, es frecuente observar el escurrimiento purulento a través de la vulva, sostienen, (Galina y Valencia., 2006) citados por Herrera, 2013.

### **2.1.3 Metritis**

Se caracteriza por la presencia de exudado purulento en el útero, este material puede ser observado en los labios de la vulva y en la cola del animal; y en ocasiones únicamente es detectable mediante el examen de los genitales internos por vía rectal (Bearden *et al.*,2004); Como otro factor también podemos mencionar que la retención de placenta afecta del 5 al 10% de los partos y aumenta en gran medida el riesgo de metritis (LeBlanc, 2008); De acuerdo con (Martínez *et al.*,2006), citando a Brito R *et al.* (2001), la mayoría de las infecciones uterinas comienzan por una endometritis y rápidamente se afecta la capa muscular en algún grado. La endometritis crónica tiene su origen en las metritis puerperales.

Además de afectar todas las capas del útero: endometrio, submucosa, muscular y serosa (Bondurant, 1999). Según los signos clínicos se puede clasificar en metritis puerperal y metritis clínica (Sheldon *et al.*, 2006). La metritis puerperal se define como una vaca con el útero anormalmente agrandado y con descarga uterina acuosa, fétida y de color marrón rojizo, asociada con signos de enfermedad sistémica tales como disminución de la producción, depresión y fiebre, dentro de los 21 días postparto (Lewis, 1997; Lewis *et al.*, 2006) citado en (Galarza, 2007)

Por el contrario, la metritis clínica se define como una vaca que no tiene signos de enfermedad sistémica, pero tiene un útero anormalmente agrandado y descarga uterina purulenta detectable en la vagina dentro de los 21 días postparto. (Lewis, 1997; Lewis *et al.*, 2006) en Galarza, (2007).

## **2. 2. Microbiota normal del útero**

Es necesario comprender que el cuerpo de los mamíferos, debido a que mantiene relativamente estables su pH, temperatura y un aporte constante de nutrientes, provee un hábitat favorable para una gran cantidad y variedad de microorganismos (Fernández, Silveira y López, 2006). Lo que se conoce como micro flora, pero su término preciso es Microbiota comprendida por bacterias, hongos y protozoos.

Por otro lado al hablar del útero de acuerdo con Avalos, 2014 citando a (Rocha *et al.*, 2004; Boscan *et al.*, 2010) indica que este tiene barreras físicas que evitan que los agentes patógenos oportunistas colonicen el tracto genital; este es estéril, pero sin embargo gérmenes del ambiente de los animales pueden colonizarlo durante el parto o en el tiempo inmediato a este (Sheldon, 2004) , por otro lado (Fernández, Silveira y López ,2006), manifiesta que la Microbiota del útero es muy amplia y depende del estado fisiológico del animal y de distintas circunstancias, como la edad de los animales, de las categorías de los animales, dependiendo según se trate de hembras adultas clínicamente sanas, gestantes, en puerperio o de vacas con repetición de servicios e infecciones clínicas, según las condiciones ambientales de la zona de estudio y factores externos como el método y la frecuencia del muestreo, el medio donde se toman las muestras, el estado reproductivo y el origen de los microorganismos aislados.

### **2.2.1. En vacas clínicamente sanas**

En función de lo planteado Gómez, (2006) expresa que la Microbiota del útero bovino es muy amplia en la cual existen gérmenes que forman parte de la Microbiota natural propia o transitoria del aparato reproductor sin que esto signifique que los animales están enfermos; Las complicaciones surgen cuando se conjuga una baja condición corporal del animal y un sistema inmune débil y se rompe el equilibrio biológico

Considerando lo antes citado se incluye un reporte, en donde se investigaron bacteriológicamente 193 muestras de moco cervical y 104 del contenido del lumen uterino, extraídas de vacas clínicamente sanas en diferentes puntos del ciclo estral. Dando como resultado que la *Escherichia coli* fue el germen de mayor incidencia en las muestras del cérvix (28,1 %) y útero (23,1 %). Con menor frecuencia se aislaron otras entero bacterias y bacterias de los géneros *Staphylococcus* y *Streptococcus* citando a Davidson, (1996).

### **2.2.2. En la gestación y en el puerperio**

Durante la gestación y el parto, empleando las palabras de Davidson, (1996) da a conocer que la Microbiota propia del cérvix y útero se modifica, por lo que el hallazgo de microorganismos saprofitos en estos períodos es normal, notablemente el útero en esta etapa tolera un crecimiento latente de bacterias sin que esto causen daños.

De la misma forma (Hussain, 1990 y De Luca, 2003) Citado por Gómez, (2006) afirman que la Microbiota cultivada durante el período puerperal temprano, presenta un amplio espectro de contaminantes ambientales tales como, *E. coli*, *A. pyogenes*, *P. aeruginosa*, *Staphylococcus* sp, *Streptococcus* sp, *P. multocida* y varias especies anaerobias como *Clostridium* sp, *Bacteroides* sp. y *Fusobacterium* sp; Sin embargo, a medida que la involución uterina progresa, la mayoría de esas bacterias son eliminadas.

### **2.2.3. En vacas infecundas**

Uno de los mayores problemas en ganadería son las vacas infecundas (no preñan), pueden estar causados por trastornos inflamatorios del útero de etiología indistinta que produce fallos reproductivos en el ganado bovino y su frecuencia (Hussain *et al.*, 1990).

En la opinión de Jaureguiberry, (2015), el ambiente uterino alberga y sostiene a un embrión, sin embargo, cuando existe alguna alteración o anomalía dentro del útero compromete la supervivencia del embrión y conlleva a la aparición del síndrome de vaca repetidora

En relación a lo antes expuesto, en diferentes estudios se reportan una correlación positiva entre la incidencia de vacas repetidoras de celos y anomalías en el endometrio (Hussain *et al.*, 1990); por lo que Francos, (1999) citado por (Fernández *et al.*, 2006) menciona en un estudio que entre el 3,5 y 5,7 % de vacas que reportaron metritis, también reportaron celos repetidos, esto se debe a la presencia de agentes patógenos que producen la metritis a lo que (Sánchez *et al.*, 2011) corrobora en un estudio, donde muestras de secreciones de vacas infecundas, reportaron la presencia de *A. pyogenes* en mayor frecuencia, siguiéndole en incidencia el *Streptococcus sp.* y *Escherichia coli*; entonces la aparición de fallos reproductivos después de que un animal haya sufrido metritis se vuelve cada vez más frecuente.

### **2. 3. Mecanismos de defensa del útero**

Fernández, (2006), afirma que los agentes microbianos intervienen en la contaminación del útero, existiendo así un grupo de factores que lo predisponen detallados a continuación citando a (Mongiardino, 1989).

- Manejo y medio ambiente: factores relacionados con el alta, producción, el estrés, y las enfermedades metabólicas y carenciales.
- Condiciones alrededor del parto: Traumatismos, la higiene, la poca relajación del canal del parto y distocias.
- Condiciones uterinas: considera el tono uterino, la disminución de la inmunidad local, la capacidad fagocitaria de los leucocitos y la aparición del primer celo posparto.
- El feto es expulsado durante el parto y el aparato genital se expone al medio ambiente existen bacterias que residen en la parte posterior de la región del animal y en el área perineal, las cuales pueden producir infecciones en el útero.

Por otro lado Morales, (2012) menciona a (Arthur, 2003), refiere que la mucosa del útero, mantienen un mecanismo fisiológico de defensa contra las infecciones uterinas; Dicho

mecanismo de defensa de los órganos de reproducción incluye factores que se detallan a continuación: alteraciones de la composición de las secreciones genitales, cambios de pH, cambios del nivel de anticuerpos, alteraciones en la actividad fermentativa y sobre todo, cambios en el volumen de las células del sistema retículo-endotelial, cuyo número aumenta notablemente. Se ha informado además que, si los mecanismos de defensa del tracto reproductivo se deterioran o debilitan, las bacterias pueden colonizar en el útero y conducir al desarrollo de infección uterina. (Torres, 1997).

Uno de los mecanismos suele ser cuando los linfocitos se infiltran suelen ser por la introducción de bacterias durante los procesos de inseminación o monta, o por la presencia de los espermatozoides en el útero, ya que constituyen un mecanismo de defensa del útero pues el moco cervical tiene elevadas cantidades de leucocitos, dichos leucocitos tienen la propiedad de impedir la introducción de factores perjudiciales a la fecundación tales como espermatozoides muertos o bacterias, (Morales, 2012).

Brito (1992) citado por, (Morales, 2012), valoró que alrededor de los dos días después de producirse el parto, este sistema de defensa es estimulado por los microorganismos que invaden y además la Microbiota normal actúa como un sistema de defensa primaria ya que el útero esta saludable y la vaca es capaz de controlar rápidamente la invasión bacteriana durante el puerperio, mediante la infiltración leucocitaria, la suplementación de sangre y la relajación del cuello uterino.

#### **2. 4. Tratamiento de las infecciones uterinas**

Un tratamiento ideal para las infecciones uterinas debe estar compuesto por la erradicación de la infección bacteriana sin suprimir los mecanismos naturales de defensa en el útero, sin inhabilitar la carne o la leche para el consumo humano, Paisley *et al.*, (1986).

La terapia de las infecciones uterinas en general, pueden ser clasificadas en cuatro grandes grupos de sustancias: sulfamidas, antibióticos, antisépticos y hormonas de acuerdo con Fernández, 2006, con base en Hussain *et al.* (1991).

## **2. 5. Resistencia bacteriana**

Las bacterias como todos los seres vivos exhiben mecanismos biológicos, que las facultan para adecuarse a diversas presiones ambientales (Cabrera *et al.*, 2007); Los patrones de resistencia bacteriana se dan por la falla en reconocer procesos fisiológicos normales en el período posparto (Paisley, 1986) a ello se le atribuye la excesiva utilización de antibióticos la cual se considera el principal factor contribuyente a la aparición de diversas clases de resistencia bacteriana (Ang, J., Ezike, E. y Asmar, 2004); Sin embargo, la sobrestimación de la capacidad curativa de los antibióticos y quimioterapéuticos ha llevado progresivamente al uso inapropiado y al abuso de estas drogas, frente a lo cual los microorganismos reaccionaron rápidamente exhibiendo todo su potencial genético para resistir a la acción terapéutica de éstos (Busso *et al.*, 2006).

Dichos en otras palabras por Bantar *et al.* (1998) citado por (Martínez *et al.*, 2006), menciona que la expansión de los microorganismos resistentes a antibióticos provoca un incremento en la tasa de mortalidad y una seria complicación en los índices de morbilidad y de efectos secundarios; En los últimos años se ha observado un incremento progresivo de este fenómeno, hecho que ha despertado una gran preocupación y alarma no sólo entre los científicos y profesionales médicos, sino en la población en general (Wilkie *et al.*, 1972) en (Martínez *et al.*, 2006), esto también se debe al empleo a dosis incorrectas de estos productos o de forma indiscriminada de los mismos.

## **2. 6. Generalidades de las cepas de bacterias**

Como señala (Méndez, 2008) citando a Brock, (2000), debe señalarse que en el grupo de bacterias Gram positivas habitualmente se establece el enlace de varios aminoácidos cuyo número y tipo depende de la bacteria por ejemplo en *Staphylococcus aureus*, esta es la bacteria gram positiva que mejor se conoce, el puente está formado por cinco glicinas conectadas por enlaces peptídicos; Usualmente las bacterias Gram positivas retienen el colorante cristal violeta de la tinción de Gram (realizada por el médico danés Hans Christian Gram), debido a que los alcoholes y otros solventes orgánicos no penetran en las paredes celulares deficientes en lípidos; siendo más resistentes a efectos de desecación, calor, luz solar y sustancias químicas, mencionado por (Méndez, 2008) en Mattar y Melo, (1998).

En cuanto a las Bacterias Gram negativas la pared celular de esta clase de bacterias es compleja desde el punto de vista químico, estructuralmente posee una membrana citoplasmática fosfolipídica, rodeada por una capa de peptidoglicano que constituye solo el 10% de la pared que delimita el espacio periplasmático, así como una pared externa que contiene elementos intercalados como lipopolisacáridos (LPS); Una propiedad biológica importante de la membrana externa de muchas bacterias Gram negativas es que resulta habitualmente tóxica para los animales. Bacterias Gram negativas patógenas para animales incluyen miembros de los géneros *Salmonella*, *Shigella* y *Escherichia coli* entre otros es mencionado por (Brock, 2000) en Méndez, (2008).

## **2.7. Bacterias ACCT®**

Las cepas de bacterias ATCC® son microorganismos certificados para el control de calidad en microbiología y es utilizado en disciplinas como la clínica, alimenticia, farmacéutica, cosmética o ambiental; sus características genotípicas y fenotípicas garantizan la identidad del microorganismo y al tener esta documentación, el laboratorio encargado de evaluar ya no realizará pruebas adicionales para la identificación de las cepas, lo que ahorra tiempo y recursos en las experimentaciones (Curtiellas *et al.*, 2005).

### **2.7.1. *Staphylococcus aureus*.**

Los *Staphylococcus* son un amplio grupo de bacterias Gram-positivas, cuyo diámetro oscila entre 0.5 y 1.5 micras, una de sus principales características es la división en agrupaciones que se asemejan a racimos de uvas, este género tiene una gran capacidad de adaptación por lo cual afectan a toda clase de mamífero (Zendejas, Avalos y Soto .2014).

“*Staphylococcus aureus* es un microorganismo que se encuentra ampliamente diseminado en el ambiente ya que posee características particulares de virulencia y resistencia contra antibióticos” (Zendejas, Avalos y Soto. 2014); es considerado un patógeno con gran potencial para causar múltiples infecciones en los animales, *S. aureus* es la especie tipo del grupo, considerada la más virulenta, responsable de un amplio espectro de enfermedades; El impacto de las cepas de *S. aureus* sobre la salud es la resistencia que puede presentar a múltiples antibióticos. A través de los años se ha incrementado la tasa de morbilidad y mortalidad a pesar

del gran número de antibióticos disponibles que existen (Cervantes, García y Salazar. 2014); Desde el punto de vista genómico, la resistencia se produce por selección natural a través de mutaciones producidas al azar; asimismo, *S. aureus* tiene características genéticas que le han permitido convertirse en una de las bacterias más importantes (Zendejas, Avalos y Soto. 2014)

En un estudio realizado para determinar la resistencia de este patógeno a múltiples antibióticos, con lo que se limitan mucho, las alternativas terapéuticas y quedan los antiguos antimicrobianos, como los glucopéptidos, como una de las pocas opciones disponibles para el tratamiento de infecciones graves, o bien antimicrobianos como la tetraciclina, la doxiciclina, la rifampicina y la trimetoprima-sulfametoxazol (Lozano *et al.*, 1998).

Tovalino y Contreras (2010), evaluaron el efecto antibacteriano in vitro del extracto etanólico de propóleo de sobre cultivos de *Streptococcus mutans* (ATCC<sup>®</sup> 25175) y *Staphylococcus aureus* (ATCC<sup>®</sup> 25923) en el cual estudiaron la acción antibacteriana contra el *S. aureus* de los EEP, reportando que el propóleo al 10 % presentó una media de 9,95 mm de halo de inhibición con una desviación estándar de 0,62 mientras que el propóleo al 30 % presentó una media de 11,77 mm de halo de inhibición con una desviación estándar de 0,19 concluyendo que el 30% tuvo mayor efecto antibacteriano.

### **2.7.2. *Escherichia coli***

Es un bacilo Gram negativos, no esporulante, en su cubierta consta de tres elementos: la membrana citoplasmática, la membrana externa y, entre ambas, un espacio periplásmico constituido por péptido-glucano. Esta última estructura confiere a la bacteria su forma y rigidez, y le permite resistir presiones osmóticas ambientales relativamente elevadas (Canet, 2016).

Entre los factores que intervienen en el poder patógeno de *E. coli*, entre ellos se encuentran la adhesión viene determinada por la presencia de fimbrias, que proporcionan a las células la capacidad de fijarse de forma específica a un receptor celular; Esta adhesión se realiza por una proteína de la membrana externa denominada intimina, que tiene un papel esencial en el anclaje de *E. coli* en las células epiteliales de mamíferos, propiciando la primera etapa de la colonización (Canet, 2016).

Esta bacteria también se presenta en el útero de los bovinos postparto ya que es un buen ambiente para el crecimiento bacteriano, ya que es templado, lleno de líquido y contiene una cantidad variable de tejidos necróticos, propicio para cultivar una gran variedad de bacterias provocando infecciones que generalmente involucran a *Escherichia coli* (Palmer, 2007).

## **2. 8. Medios de cultivo y recuentos de microorganismos.**

Un medio de cultivo, ya sean preparaciones sólidas, semisólidas o líquidas, constituyen el micro mundo de los microorganismos en condiciones de laboratorio, intentando ser un reflejo de su hábitat natural en relación con la satisfacción de sus más vitales y principales necesidades como ser vivo de acuerdo con (Herrera, 1985) en (Nápoles *et al.*, 2006). El diseño de un medio de cultivo responderá entonces a las exigencias del micro-organismo en cuestión y a la finalidad que se persigue con su multiplicación. (Nápoles *et al.*, 2006).

Cabe considerar , por otra parte que uno de los parámetros importante en un medio de cultivo son la humedad la cual es indispensable para el crecimiento de microorganismos, ya que su carencia (deseccación) puede llevar a la muerte del microorganismo, por otro lado el pH debe ser óptimos para el desarrollo bacteriano, es indispensable para su aislamiento pues si existen variaciones ácidas o alcalinas, pueden inhibir su crecimiento por último la transparencia esta permite la observación bacteriológica, evidenciar morfológica y físicamente su crecimiento en medios de cultivo adecuado (Triviño, 2011). En términos generales, un medio de cultivo se prepara correctamente siguiendo las indicaciones relacionadas a continuación:

Disolución del medio de cultivo deshidratado, Se debe emplear agua limpia, con pH lo más cercano posible al neutro, Vertido en placa, en esta se debe remover previamente el medio de cultivo en sentido circular para entremezclarlo de manera uniforme, para finalmente verter el medio a las cajas Petri a temperatura de vertido, evitando la formación de humedad en la tapa de la caja a si mismo los Tubos de agar inclinado (bisel o pico de flauta), y sin inclinación, estos tubos llenos de medio de cultivo, todavía líquido, se colocan en una posición inclinada de tal forma que se forme una placa de aproximadamente 3cm y una superficie inclinada de iguales dimensiones o a su vez colocarlo en una gradilla (Rojas, 2011).

### **2.8.1. Técnica de recuentos de microorganismos.**

Por método indirecto, tenemos la Escalas o patrones de McFarland. Técnica basada en turbidimetría, en la cual los patrones de McFarland, permiten establecer una relación entre una precipitación química y una suspensión de bacterias (Rojas, 2011).

A sí mismo el recuento en placa estándar o recuento de microorganismos viables, los reportes de esta metodología se refieren a “unidades formadoras de colonia” o UFC; unidad que, corresponde como mínimo a una bacteria formando una colonia, así como, también a un grupo de estas que han sido las formadoras de la misma. (Rojas, 2011).

### **2.9. Antibiograma**

El antibiograma es un complemento de la interpretación o de la categorización de los resultados de sensibilidad (Nodarse, 2013); retomando la expresión consiste en el reconocimiento fenotípico de los mecanismos de resistencia y permite, a partir de éste, la inferencia de fenotipo inicial, que tiene objeto evaluar en el laboratorio la respuesta de un microorganismo a uno o a varios antimicrobianos, finalmente traducir, en una primera aproximación, su resultado como factor predictivo de la eficacia clínica, (Cantón, 2010).

Basados en la difusión o en el cálculo de la concentración mínima inhibitoria (CMI) en la cual se presenta la siguiente categoría (Quintana, 2005).

- Sensible: cuando un aislado bacteriano es inhibido in vitro por una concentración de un antimicrobiano que se asocia a una alta probabilidad con el éxito terapéutico.
- Intermedio: cuando un aislado bacteriano es inhibido in vitro por una concentración de un antimicrobiano que se asocia a un efecto terapéutico incierto.
- Resistente: cuando un aislado bacteriano es inhibido in vitro por una concentración de un antimicrobiano que se asocia a una alta probabilidad con el fracaso terapéutico.

Punto de corte / criterio de interpretación: el valor de CIM o el halo de inhibición utilizado para indicar sensible, intermedio y resistente se definen como se explicó anteriormente, con el siguiente criterio de interpretación Malbrán, (2012):

**Tabla 2-1. Criterio de interpretación de antibiograma**

	CIM ( $\mu\text{g/ml}$ )	Halos de inhibición (mm)
Sensible	$\leq 4$	$\geq 20$
Intermedio	8-16	15-19
Resistente	$\geq 32$	$\leq 14$

Fuente: Malbrán, (2012)

## **2. 10. Propóleos**

### ***2.10.1. Origen del propóleos***

Los propóleos son una resina cética, de composición compleja y consistencia viscosa, que las abejas elaboran a partir de partículas resinosas de diferentes brotes de hojas y flores y que utilizan en la construcción, reparación y protección de la colmena, a las cuales las abejas añaden secreciones salivares, cera y polen para la elaboración del producto final (*Farré, Frasquet y Sánchez, 2004*); corroborando lo antes expuesto los propóleos “Son una mezcla de diferentes cantidades de ceras y resinas recolectadas por las diferentes abejas directamente de determinadas plantas, generalmente de sus brotes de hojas y flores”. Polaino C, (2006, p.288).

### ***2.10.2. Características de los propóleos***

Es una sustancia compleja que está constituida por una gran variedad de compuestos químicos, la composición no es estable y varía según la procedencia; la propiedad más importante del propóleo es su actividad antibacteriana, a la cual se les atribuye a los flavonoides. (Tovalino y Contreras. 2010); en cuanto a su componente principal, son “resinas compuestas por flavonoides como se menciona anteriormente además de ácidos fenólicos o sus esterés, alcanzando a menudo hasta el 50% del total de los ingredientes aunque esto depende mucho de la cantidad de cera que contenga” (Polaino, 2006, p.288), estos componentes químicos son

responsables por sus actividades biológicas beneficiosas, y es especialmente por su poder antimicrobiano y antioxidante Banskota *et al.*(2001) en (Bankova *et al.*, 2007)

Entre los 20 y los 45°C su consistencia es suave, flexible y adhesiva, pero al enfriarse se endurece y se hace quebradiza alrededor de los 15 °C, cuando esto ocurre a temperatura de congelación, no recupera anteriores características, a más de 45°C cada vez son más pegajosos y se vuelven líquidos: El disolvente más usado para su extracción comercial es el alcohol etílico, usándose también en éter, glicol y el agua y la mayoría de sus componentes antibacterianos son solubles en agua y alcohol (Polaino, 2006, p.288).

### ***2.10.3. Mecanismo de Acción del Propóleo***

Actualmente no están completamente estudiados todos los mecanismos por los cuales el propóleo puede inhibir la presencia de ciertos patógenos; sin embargo, algunos de los componentes encontrados en los propóleos, como ácidos aromáticos y ésteres, compuestos cinámicos y flavónicos, alteran las membranas celulares, inhiben la ARN polimerasa y reducen la motilidad bacteriana, lo cual contribuye a su acción y al sinergismo observado con algunos antibióticos citando a (Takaisi-Kiku-ni y Schilcher, 1994; Mirzoeva *et al.*, 1997) por Sánchez *et al.* (2013).

Sin embargo, Huaytalla *et al.* (2018). menciona que su mecanismo de acción antibacteriano está dado por la inhibición de la división celular, disrupción del ADN, desorganización de la membrana citoplasmática e inhibición de la síntesis de la pared celular, causando bacteriólisis parcial e inhibiendo la síntesis proteica.

En tal sentido Velásquez y Montenegro, (2017). Atribuyen lo anteriormente mencionado a los flavonoides presentes en los propóleos, ya que poseen una acción directa sobre las membranas de algunas bacterias, reduciendo su capacidad de permeabilidad y haciéndola más frágil. Además, los flavonoides se caracterizan por actuar de forma similar al ácido nicotínico, dándole propiedades oxido reductoras, en sinergia con el ácido ascórbico (López *et al.* 2012).

## **2. 11. Estudios sobre el extracto Hidro-alcohólico del propóleo**

Tovalino y Contreras (2010), Evaluaron de manera in vitro del efecto antibacteriano del extracto etanólico de propóleo de Oxapampa – Perú sobre cultivos de *Streptococcus mutans* (ATCC® 25175) y *Staphylococcus aureus* (ATCC® 25923) con la utilización de dos concentraciones de propóleos 10% y 30% en el cual Se determinó que para el *S. aureus*, el EEP al 30% presentó mayor eficacia y se encontró que las dos concentraciones de propóleo a las 24 y 48 horas mostraron diferencia significativa, se concluyeron que el EEP al 30% tuvo mayor efecto antibacteriano.

Galarza, (2013). Evaluó la actividad antibiótica in vitro del Extracto Etanólicos del Propóleo (EEP) como alternativa natural para combatir a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*. presentes en la metritis clínica de vacas lecheras; en la cual se comparó con el grado de sensibilidad de los Extractos Etanólicos de Propóleo al 10% y 30% mismos que fueron elaborados previamente, en la cual comprobó que las dos concentraciones de EEP. Al 10% y 30% dan resultados en su halo de inhibición antibacteriana similares, sobre *Staphylococcus aureus* estadísticamente hablando el objetivo de la investigación fue establecer la relación que existe entre la composición química y la actividad antibacteriana de diferentes extractos de propóleos que fueron colectados en diferentes lugares de la provincia del Azuay y Loja, determinando su posible aplicación en la industria cosmética como un conservante natural o sustancia activa biológicamente.

Guaraca y Palomino, (2018). En un estudio de la composición química y actividad antibacteriana de muestras de Propóleos de diferente localización geográfica manifiesta que su actividad microbiana por el método de microdilución en placas frente a cepas de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* siendo presentó igual efectividad frente a las cuatro bacterias objeto de estudio, haciendo mención que para las bacterias del tipo *Staphylococcus aureus* resultó la especie bacteriana más resistente, ya que necesitó la mayor concentración.

## CAPÍTULO III

### 3. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

#### 3.1. Localización y duración del experimento

La investigación se desarrolló en la Facultad de Ciencias Pecuarias, en los laboratorios de:

- Nutrición Animal y Bromatología
- Biotecnología y Microbiología Animal.
- Ciencias Químicas

Los tres laboratorios se encuentran ubicados en la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, cantón Riobamba, provincia de Chimborazo, a continuación, se detallan las condiciones meteorológicas (Tabla 3-1).

**Tabla 3-1. Condiciones meteorológicas del cantón Riobamba.**

Parámetros	Valores Promedios 2020
Temperatura °C	13,8
Humedad relativa %	70,2
Precipitación mm	42,8
Altitud msnm	2850
Longitud W	78o 40' 59''
Latitud S	01o 38' 51''

Fuente: Estación Agro meteorológica, Facultad de Recursos Naturales, ESPOCH (2020).

Realizado por: Leidy Alban, 2020

La investigación tuvo una duración de 3 meses, Tiempo durante el cual se desarrollaron todas las actividades planificadas para cumplir con los objetivos específicos.

#### 3.2. Unidades experimentales

En la presente se utilizaron 2 tipos de Bacterias ATCC®, causantes de Metritis, (Staphylococcus aureus subsp. Aureus y Escherichia coli) para realizar pruebas in-vitro

mediante la utilización de cuatro diferentes concentraciones de extracto Hidro-alcohólico de Propóleos de Abejas.

### **3.3. Materiales, equipos, e instalaciones**

Los materiales, equipos e instalaciones que se utilizaron son los siguientes:

#### **3.3.1. Materiales**

- **Matraces Erlenmeyer**

Recipiente de vidrio el cual se utilizó para evitar pérdidas de la sustancia o solución contenida por evaporación.

- **Embudo**

Recipiente de vidrio que permitió canalizar el flujo proveniente de la parte superior al en el interior de un Matraz

- **Espátula**

Lamina plana de metal con apariencia similar a la de un cuchillo redondo, la cual sirvió para recoger compuestos sólidos en forma de polvo

- **Probeta**

Tubo trasparente de vidrio en el cual se midió el volumen de líquido.

- **Papel Aluminio**

Lamina de un grosor menor a 0,2 mm, la cual sirvió para cubrir el matraz.

- **Fundas ziploc**

Bolsas con banda zipper la cuales se utilizaron con el fin de proteger propóleo de contaminación externa.

- **Papel filtro**

Papel usado para filtrar impurezas insolubles y a su vez permitiendo el paso de la solución a través de sus poros.

- **Cajas Petri**

Recipiente redondo transparente, de vidrio utilizadas para cultivar y aislar microorganismos.

- **Tubos de ensayo**

Instrumento de forma cilíndrico de plástico, contenedor de líquidos los cuales fueron sometidos a pruebas.

- **Asas calibradas desechables**

Instrumento para la siembra de cultivos microbianos.

- **Mechero**

Utilizado para calentar muestras y para esterilizar un ambiente de siembra de bacterias.

- **Cubre y porta objetos**

En cuanto al porta y cubre objetos las cuales son placas finas transparentes utilizadas con el fin de observar bajo el microscopio los microorganismos en estudio.

- **Frascos color ámbar**

Botella de vidrio que tiene como función principal protección de la luz de muestras sensibles.

- **Toallas desechables**

Papel absorbente para labores de secado y limpieza.

- **Pinza para tubos de ensayo**

Estructura metálica parecida a una tenaza la cual sirvió para sujetar los tubos de ensayo mientras se calientan y manipulan.

### 3.3.2. *Equipos*

- **Congelador**

Su función principal fue de congelar de manera conveniente muestras, de propóleos a una temperatura por debajo de  $-20^{\circ}\text{C}$ .

- **Estufa**

Por medio de esta se realiza desarrollo de los cultivos bacterianos a una temperatura de  $37^{\circ}\text{C}$

- **Refrigerador**

Mantiene un ambiente controlado para diversos fluidos y sustancias utilizadas en la investigación, con el fin de que los mismos se conserven en buenas condiciones.

- **Baño María (Quimis modelo G215M1)**

Equipo utilizado para incubar muestras en agua a una temperatura constante durante un período de tiempo.

- **Rotavapor**

El Rotavapor marca Buchi V-300, por medio de este se realizó una destilación a vacío la cual permite la evaporación rápida de disolvente de una disolución, recuperando el soluto.

- **Bomba de Vacío**

La Bomba de Vacío marca V-300, sirve para destilar disolventes de cualquier volumen y con cualquier punto de ebullición, con la finalidad de eliminar en su totalidad los sólidos presentes.

- **Balanza**

El equipo marca Cimarec 2 utilizada, en el pesaje de muestras en el laboratorio con muy poco margen de error, la cual debe ser calibrada antes de ser usada ubicándola en espacios que no sufran movimientos o vibraciones, con una capacidad: 520 g.

- **Microscopio (Marca Lyon)**

Utilizado en la observación de muestras con finalidad de observar el crecimiento de las bacterias en estudio con mayor precisión.

- **Agitador magnético**

Agitador marca Lyon, usado para remover la mezcla líquida dentro de la investigación.

- **Cabina de flujo laminar**

La cabina de Flujo Laminar Marca Lyon serie AUD, proporcionó un aire limpio y constante con el fin de evitar la suspensión de partículas, así como una posible contaminación de las muestras.

### 3.3.3. *Insumos*

- **Agua destilada**

Gracias a su gran margen de pureza debido a que se encuentra limpia de electrolitos, sales minerales, microorganismos y otras sustancias contaminantes, es un principal componente empleado para la elaboración del extracto.

- **Alcohol potable**

También conocido como alcohol etílico utilizado como compuesto de partida en la síntesis del extracto a realizar.

- **Propóleo**

Base principal de la investigación el cual es producido por las abejas y es una mezcla resinosa obtenida de las yemas de los árboles, exudados de savia u otras fuentes vegetales que luego se procesan en la colmena.

- **Disco de sensibilidad penicilina y tetraciclina**

Utilizado para realizar antibiogramas con una concentración mínima inhibitoria que de antibiótico.

- **Agar**

Medio nutritivo para el cultivo de bacterias, el cual al ser suplementado con sangre permite el crecimiento y visualización.

- **Escherichia coli ATCC® 25922 y Staphylococcus aureus subsp. aureus ATCC® 12600**

Una cepa de control para pruebas de sensibilidad a los antimicrobianos en medios de cultivo bacterias Gram positivas y Gram negativas.

### **3.3.4. Instalaciones**

Para llevar a cabo la presente investigación se usó de los laboratorios de la Facultad de Ciencias Pecuarias y Ciencias Químicas de la Escuela Superior Politécnica de Chimborazo:

- Laboratorio de Nutrición Animal y Bromatología conjuntamente con el Laboratorio de Química Orgánica: En el cual se elaboró el Extracto Hidro-alcohólico de Propóleos de Abejas para la posterior utilización dentro de la presente investigación.
- Laboratorio de Ciencias Químicas: Una vez elaborado el extracto de Propóleos de Abejas se realizó un análisis del producto final, bajo el método espectrofotométrico desarrollado por FOLIN y CIOCALTEAU.
- Laboratorio de Biotecnología y Microbiología Animal: Se llevó a cabo inoculación de bacterias y la aplicación del EHAPA para posteriormente realizar la tabulación de los resultados obtenidos.

### 3.4. Tipo de investigación

En el presente estudio se utilizó una investigación de tipo experimental la cual consistió en analizar el efecto producido por Extracto Hidro-alcohólico de propóleos de abejas, frente a bacterias ATCC® causante de Metritis; se realizó un análisis de correlación de las variables utilizando INFOSTAT versión 2019.

### 3.5. Método de investigación

La metodología aplicada en la presente investigación es descriptiva, en la cual se tendrán tres variables en estudio mediante la recolección de datos en un tiempo determinado y para determinar los cambios en las variables.

### 3.6. Tratamientos y diseño experimental

Se utilizaron 2 tipos de bacterias *Staphylococcus aureus* subsp. *Aureus* y *Escherichia coli*, divididas en cinco tratamientos: T0= tratamiento testigo; T1= (15%) EHAPA; T2= (30%) EHAPA; T3= (45%) EHAPA; T4= (60%) EHAPA; cada tratamiento estuvo conformado por 3 repeticiones, las cuales constituyeron como unidades experimentales. Cabe recalcar que se adicionó dos tratamientos antibióticos T5= Oxi-Tetraciclina® y T6= Penicilina® de manera independiente como referencia para medir la sensibilidad en la presente investigación. Distribuidas bajo un Diseño Completamente al azar para cada tipo de bacteria; adecuados al siguiente modelo lineal.

$$Y_{ij} = \mu + t_i + \epsilon_{ij}$$

Dónde:  $Y_{ij}$  = Valor del parámetro en determinación.

$\mu$  = Valor de la media general.

$t_i$  = Efecto de los tratamientos (concentración de EHAPA)

$\epsilon_{ij}$  = Efecto del error experimental.

En la tabla 3-2 y 3-3, se describe el esquema del experimento empleado en cada una de las Bacterias.

**Tabla 3-2. Esquema del experimento, bacterias *Staphylococcus aureus* subsp. *Aureus***

Niveles de EHAPA	Código	Repetición	TUE	Total de muestras
Testigo (T0)	EHAPA.T0.S	3	1	3
(15%) EHAPA	EHAPA.T1.S	3	1	3
(30%) EHAPA	EHAPA.T2.S	3	1	3
(45%) EHAPA	EHAPA.T3.S	3	1	3
(60%) EHAPA	EHAPA.T4.S	3	1	3
Oxi-Tetraciclina	O T5.S	3	1	3
Penicilina	P T6.S	3	1	3
<b>TOTAL</b>				<b>21</b>

**Tabla 3-3. Esquema del experimento, bacterias *Escherichia coli***

Niveles de EHAPA	Código	Repetición	TUE	Total de muestras
Testigo (T0)	EHAPA.T0.E	3	1	3
(15%) EHAPA	EHAPA.T1.E	3	1	3
(30%) EHAPA	EHAPA.T2.E	3	1	3
(45%) EHAPA	EHAPA.T3.E	3	1	3
(60%) EHAPA	EHAPA.T4.E	3	1	3
Oxi-Tetraciclina <sup>®</sup>	O T5.E	3	1	3
Penicilina <sup>®</sup>	P T6.E	3	1	3
<b>TOTAL</b>				<b>21</b>

### 3.7. Análisis estadísticos y prueba de significancia

Los resultados experimentales se evaluaron mediante la siguiente estadística:

- Análisis de Varianza (ANOVA).

Prueba de Duncan para la separación de medias al nivel de significancia  $\alpha \leq 0,05$  y  $\alpha \leq 0,01$

El esquema del análisis de la varianza que se utilizó en el presente estudio se reporta en a continuación (Tabla 3-4 y 3-5):

**Tabla 3-4. Esquema del ANOVA, Bacterias *S. aureus***

<b>Fuente de variación</b>	<b>Grados de libertad</b>
Total	20
Tratamiento	6
Error Experimental	14

**Tabla 3-5. Esquema del ANOVA, Bacterias *E. coli***

<b>Fuente de variación</b>	<b>Grados de libertad</b>
Total	20
Tratamiento	6
Error Experimental	14

### **3.8. Mediciones experimentales**

Se realizó pruebas de sensibilidad antibacteriana; para antibiótico se siguió el método basado en el trabajo de Bauer, Kirby. (1966) y la interpretación de los resultados en función de las normas del NCCLS; por otro lado, para el Extracto Hidro-alcohólico de Propóleos de Abejas es el método de, Macrodilución en caldo en el cual se miden las UFC (Unidades de colonias formadas).

### **3.9. Procedimiento experimental**

La investigación constó de tres fases, las cuales se detalla a continuación:

### **3.9.1. Elaboración de EHAPA (Extracto Hidro-alcohólico de Propóleos de Abejas)**

En la elaboración del extracto se partió del método propuesto por Proaño, et., al. (2016) en la cual se divide en dos fases de extracción para así posteriormente realizar la mezcla de estas obteniendo como tal el extracto, a continuación, detallo el proceso realizado para la presente investigación.

Se utilizó 200 gramos de Propóleos de abeja, cuya cantidad fue fraccionada con la ayuda de un mortero, dicha cantidad se colocó en un matraz Erlenmeyer, y se añadieron 400ml de Agua destilada de tal manera que el solvente cubra el propóleo, Seguidamente se colocó en baño María marca Quimis modelo G215M1 por 24 horas a una temperatura de 45°C, pasado este tiempo se retira de Baño María y se procede a colocar el extracto en un vaso de precipitación en el cual lo dejamos reposar por 5 min y quitamos los sobrenadantes (ceras) posteriormente fue filtrado el extracto por 12 horas, una vez transcurrido este tiempo, se coloca la parte líquida en frasco color ámbar y el sólido sobrante en papel filtro por 2 horas para quitar la mayor cantidad de humedad, ya que este es base de la segunda extracción, cabe recalcar que se realizaron tres réplicas en la elaboración de este extracto.

Una vez pesado los sólidos de la anterior extracción se aforo nuevamente con 400ml de alcohol potable (Alcohol etílico al 95%), y se sometieron a baño María por 72 horas a una temperatura de 40°C, finalizado este tiempo en un Erlenmeyer forrado con aluminio se filtró a través de papel filtro por 12 horas, separando el líquido del sólido residual. Se unen los dos filtrados para dar origen al filtrado final colocándolo en un solo embace color ámbar.

Este extracto total posteriormente se filtra al vacío mediante la utilización de Bomba de Vacío marca V- 300, para eliminar en su totalidad los sólidos presentes, una vez filtrado el líquido obtenido lo pasamos por el Rotavapor V-300 a accionado en 90 rpm (revoluciones por minuto) a 45 grados buscando eliminar la mayor cantidad de alcohol posible, mediante un proceso de destilación y condensación una vez culminado este proceso finalmente obtenemos el Extracto Hidro-alcohólico de Propóleos Apícolas el cual se coloca en un frasco color ámbar previamente etiquetado, obteniendo así en las tres replicas realizadas un total de 609 ml de extracto total (Anexo A)

### ***3.9.2. Análisis de Fenoles totales expresados como Ácido Gálico***

El método espectrofotométrico desarrollado por FOLIN y CIOCALTEAU, para la determinación de fenoles totales, se fundamenta en su carácter reductor y es el más empleado descrito por García, Fernández y Fuentes, (2015). El método es: tomar 20 microlitros (uL) de la solución de propóleo, luego le agregas 380 uL de etanol y 100 uL de reactivo de Folin-Ciocalteu (los compuestos fenólicos son oxidados por el reactivo), luego 200 uL de solución saturada de Carbonato de Sodio y por último 4.3 mililitros ml de agua destilada. Le dejamos reposar 60 min y medimos la absorbancia de estas preparaciones (que adquieren un color azul) en un espectrofotómetro a la longitud de onda de 750 nm.

Previamente hacemos una curva de calibración con un fenol estándar (el ácido gálico), la cual nos permite calcular la cantidad de fenoles totales en las muestras, para así finalmente con los factores de dilución, sacamos la cantidad de fenoles totales en el extracto Hidroalcohólico de propóleos de abeja.

### ***3.9.3. Investigación de laboratorio***

Para esta fase se utilizó bacterias ATCC<sup>®</sup>, Staphylococcus aureus subsp. Aureus, bacteria anaerobia facultativa, Gram positiva y Escherichia coli un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, posteriormente se realizó la dilución en una concentración bacteriana comparada a la escala de Mc Farland 0.5, debido a que para los antibiogramas solo se utiliza esta concentración.

Partiendo de la concentración de bacterias ajustada a la escala de Mc Farland 0.5 y utilizando el agar Muller Hinton se realizó el antibiograma basados en el método Kirby-Bauer. (Bauder et al.,1966), en donde se emplearon sensidiscos de Penicilina y Oxi-Tetraciclina; para lo cual se incubaron 3 placas por tratamiento durante 16-24 horas y se estudió el crecimiento en ellas, valorando el diámetro de la zona de inhibición que se forma alrededor de cada disco y se compara con las referencias oportunas publicadas por la NCCLS; para así verificar si estas son Sensible, Intermedio o Resistente a los antibióticos utilizados.

Luego para el análisis del Extracto Hidro-Alcohólico de Propóleos de abejas, bajo el Método de Macrodilución en caldo, la concentración de bacterias ajustada a la escala de Mc Farland 0.5, se agregó de manera directa a cada tubo de dilución de Extracto Hidro-

Alcohólico de Propóleos Apícolas los mismos que se encuentran en concentraciones de 15%, 30%, 45%, 60%, cabe recalcar que los tubos deben estar tapados para evitar el ingreso de otro tipo de bacterias, por último se preparó un medio Plate Count Agar en un total de 3 placas por tratamiento y para un tratamiento testigo, en cada una de ellas se realizó la siembra del inóculo de cada uno de los tubos, después de incubar en las placas de agar, Por un lapso de 24 horas a 37°C en atmósfera aeróbica comparándolo con el número de UFC/ml del cultivo original (Testigo). Para finalmente conocer la concentración Mínima inhibitoria.

## CAPÍTULO IV

### 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 4.1. Fenoles totales

De acuerdo con (Palomino, 2019; Angulo, 2014 y Vargas, 2010), una apreciación objetiva del efecto antibiótico del propóleo apícola, se lo puede obtener al medir la cantidad de fenoles presentes en una muestra, debido a que este es uno de los principales compuestos al cual se atribuye la actividad antioxidante y antimicrobial. En el presente estudio, se midió la cantidad de fenoles contenidos, tanto en la fracción acuosa como alcohólica del propóleo apícola. En la tabla 4-1 se muestra el contenido de fenoles presentes en el Extracto Hídrico y alcohólico de propóleos de abejas.

**Tabla 4-1. Análisis de Fenoles totales expresados como Ácido Gálico del Extracto Hidro-alcohólico de Propóleos de Abejas**

Solvente	mg Fenoles /mL solución			
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	PROM $\pm$ DE
Agua destilada	13,04	13,30	13,14	13,16 $\pm$ 0,13
Alcohol potable	26,37	26,25	26,44	26,35 $\pm$ 0,10
<b>mg Fenoles totales/ml solución</b>				<b>39,51<math>\pm</math>0,23</b>

Realizado por: Leidy Alban, 2020

Cuando se utilizó agua destilada como solvente de fenoles contenidos en el propóleo apícola, existió una menor cantidad ( $13,16 \pm \text{mg/ml}$ ), frente a la obtenida con alcohol potable como solvente ( $23,35 \pm 0.10 \text{ mg/ml}$ ); este resultado es consistente con lo reportado por Bucio y Martínez. (2016), quien afirma que los principales componentes biofuncionales son menos solubles en agua.

A medida que se midió la concentración de fenoles en la mezcla de las dos fracciones, ésta mostró un efecto aditivo, sin pérdida alguna por efecto de la mezcla ( $39,51 \pm 0,23 \text{ mg/ml}$ ), hecho que muestra la viabilidad de mezclar los extractos tanto hídrico como alcohólico, propuesto por Proaño *et al.* (2016) y registrado como EHAPA

Se ha reportado que los compuestos fenólicos, ácidos aromáticos, y flavonoides son los principales constituyentes químicos responsables de las propiedades biológicas del propóleo apícola (Siripatrawan et al., 2013); y su principal efecto sería el de retardar el desarrollo y formación de biopelículas en diferentes grupos microbianos incluyendo *Listeria spp.*, *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Bacillus spp.*, *Escherichia coli* y especies de *Pseudomonas* (Stan et al., 2013) citado por Velásquez y Montenegro. (2017).

#### **4.2. Eficacia curativa de EHAPA en bacterias ATCC®.**

Se ha reportado que una forma de evaluar la eficacia curativa de un antibiótico, se basa en el grado de sensibilidad que muestran las bacterias frente a un antibiótico determinado (De la Fuente et al., 2015); y el grado de sensibilidad se podría medir a través del conteo de unidades formadoras de colonias (Sánchez, 2017), de muestras bacterianas sometidas a la acción de distintas concentraciones de antibiótico.

En el presente estudio el EHAPA, previo a la preparación de inóculos, aplicado en un medio de cultivo bajo una concentración de bacterias ajustada a la escala de Mc Farland 0,5, obteniendo los resultados que se muestran en la Tabla 4-2.

El número de UFC,  $ml^{-1}$  fue cada vez menor ( $P \geq 0,0001$ ), conforme se incrementó la concentración de EHAPA. Cuando no se aplicó ningún antibiótico, el número de UFC. $ml^{-1}$  de *E. aureus* fue de 23302,67; la disminución fue altamente significativa ( $P \geq 0,0001$ ) a medida que se incluyó EHAPA a niveles del 15% (12073,33) y tuvo el menor número de UFC,  $ml^{-1}$  a niveles del 60% (1030,33); por lo que se puede afirmar que la eficacia curativa fue alta; sin embargo, en el caso de *E. coli* fue mayor en comparación a la mostrada por *S. aureus*, puesto que la disminución del número de UFC,  $ml^{-1}$  fue más notoria en todos los niveles de inclusión, llegando a valores de 865,67 a una concentración del 60% de inclusión de EHAPA.

Los presentes resultados están de acuerdo con los reportados por Silva et al. (2012), quienes encontraron alta eficacia en *S. aureus* frente a propóleos de abejas.

**Tabla 4-2. Número de Unidades Formadoras de Colonias (UFC. ml<sup>-1</sup>) en *S. aureus* y *E. coli* ATCC® por efecto de EHAPA**

VARIABLES	NIVELES DE EHAPA®, %					EE	Prob.	Sign.
	0%	15%	30%	45%	60%			
	T0	T1	T2	T3	T4			
<i>Staphylococcus aureus</i>	23302,67	<b>a</b> 12073,33	<b>b</b> 7065,00	<b>c</b> 2892,00	<b>d</b> 1030,33	<b>e</b> 209,64	<0,0001	**
<i>Escherichia coli</i>	23302,67	<b>a</b> 11609,00	<b>b</b> 6218,33	<b>c</b> 1871,67	<b>d</b> 865,67	<b>e</b> 249,97	<0,0001	**

E.E.: Error Estándar.

Prob. < 0,01: existen diferencias altamente significativas.

Medias con letras iguales en una misma fila no difieren estadísticamente de acuerdo a la prueba de Duncan

Aquino y Arroyo (2015), reportaron que el tratamiento con 20 y 30% de propóleos estudiados por ellos, tuvo mayor efecto bactericida sobre *Staphylococcus aureus* en comparación con niveles del 10%, posiblemente porque en su estudio, ellos no incluyeron mayores concentraciones como se hizo en el presente estudio.

Carrillo (2011), evaluó la actividad antimicrobiana del propóleos de abejas, sobre bacterias Gram negativas (*E. coli*, *S. typhi* y *K. pneumoniae*); reportó que no se observó actividad antibacteriana del propóleos frente a este tipo de bacterias, lo cual difiere con los resultados encontrados en el presente estudio; este hecho se podría deber a que en el presente estudio, trabajamos con un extracto doblemente diluido (en agua y en alcohol), lo que podría garantizar una mayor efectividad antibacteriana de EHAPA puesto que existirían algunos principios activos solubles en agua y otros en alcohol; los compuestos del propóleos Hidro solubles y solubles en alcohol, podrían haber conferido mayor efectividad antibacteriana.

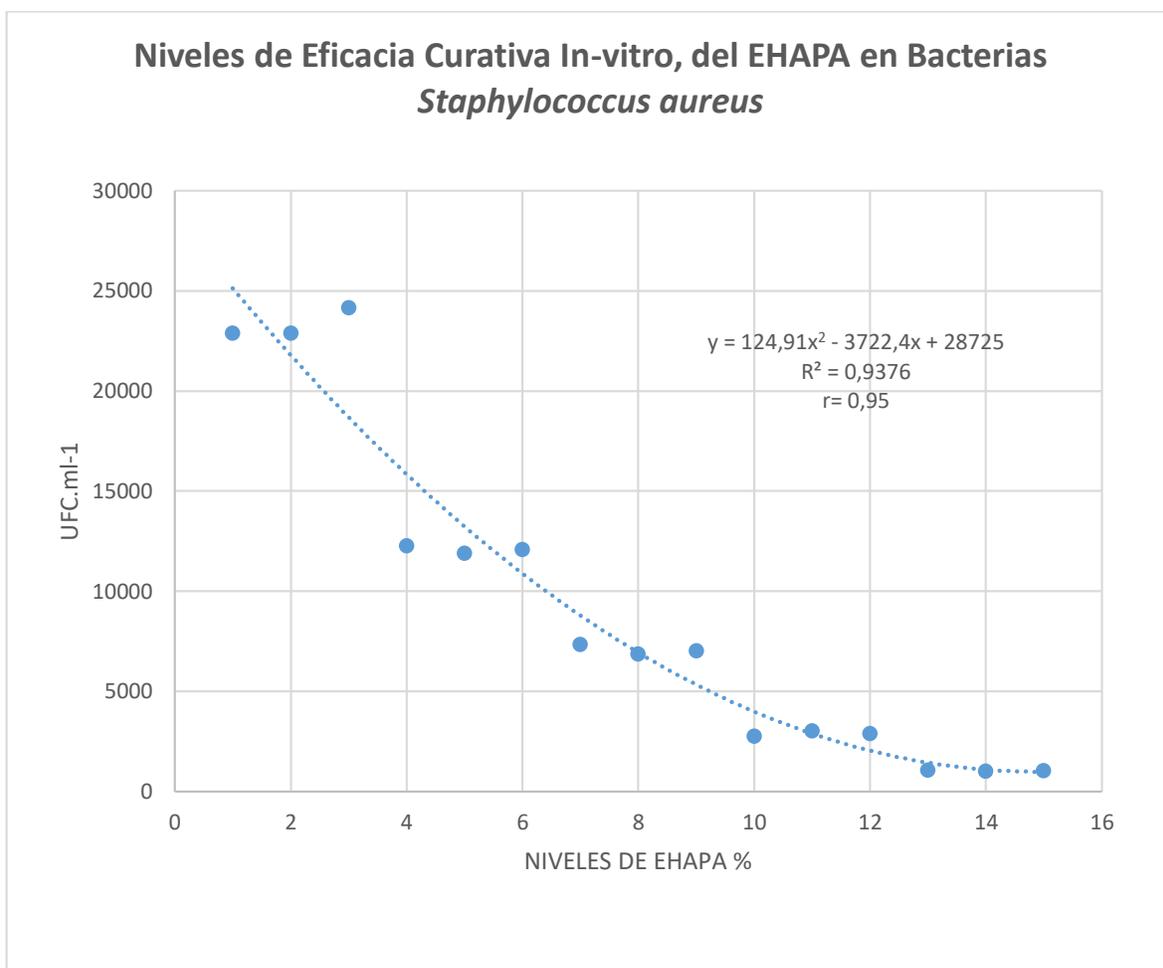
Urzúa *et al.* (1998); Brehm-Stecher y Jonson. (2003) citados por García *et al.* (2010), consideraron que *Escherichia coli* es una bacteria Gram-negativa que posee una membrana protectora adicional denominada “Estructura OM”, la cual les confiere un mayor grado de resistencia a los agentes antimicrobianos; sin embargo, en este estudio, EHAPA tuvo un mayor efecto sobre *E. coli* en comparación con *S. aureus*, en condiciones de laboratorio.

Las diferencias altamente significativas encontradas en el presente estudio, permiten suponer un alto grado de efectividad antibacteriana de EHAPA In vitro, y se abre la necesidad de conducir estudios In vivo, que permitan llegar a resultados más concluyentes.

Los niveles de confiabilidad de los resultados reportados en el presente estudio son altos ( $p < 0,0001$ ) y tienen además un importante soporte en el análisis bioquímico de concentración de fenoles presentes en la fase hídrica y alcohólica; aspecto que no hemos podido observar en los reportes de la literatura a nuestro alcance.

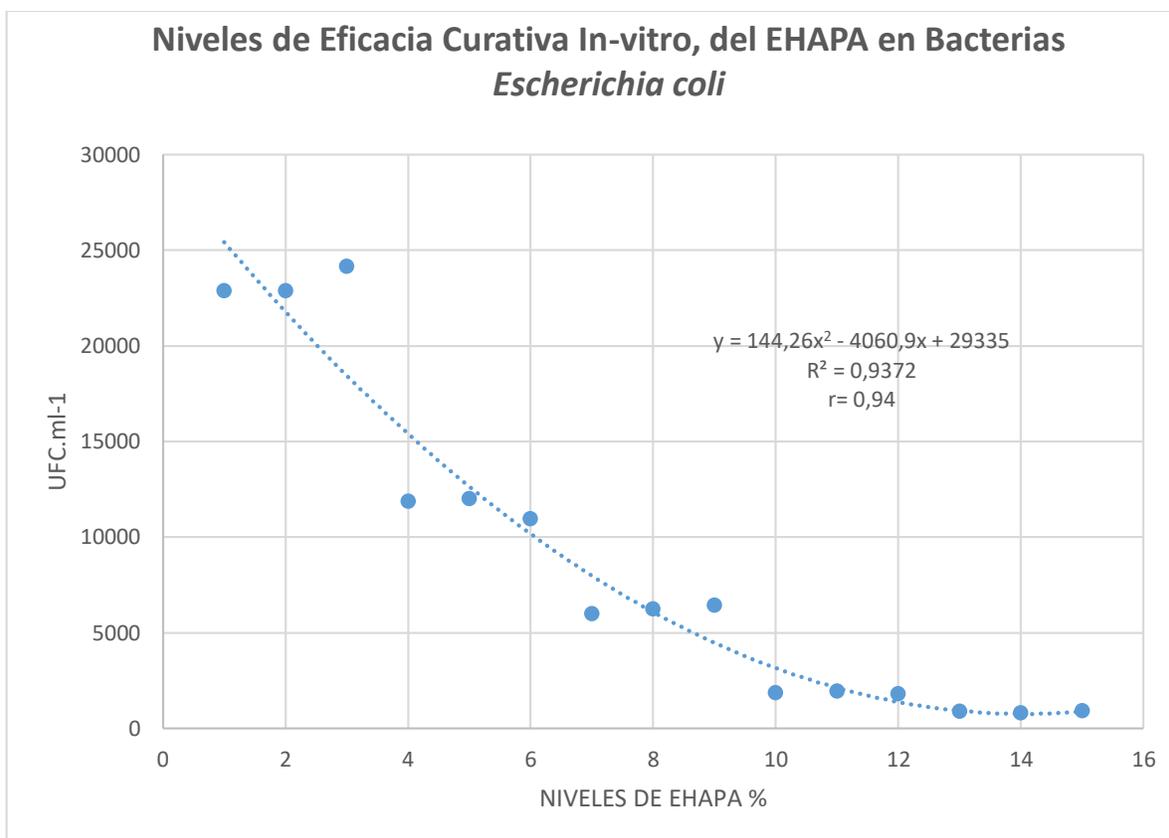
El número de UFC<sup>-1</sup> de *E. aureus*, en dependencia de las concentraciones de EHAPA (Grafico 4-1), mostró una tendencia polinómica cuadrática negativa ( $y = 124,91x^2 - 3722,4x + 28725$ ); lo que demuestra que a mayor concentración de EHAPA, el número de UFC disminuyó. Se identificó un mayor nivel eficacia con una concentración del (60%). Se encontró además que, a medida que se incrementa el porcentaje de concentración de EHAPA, el número de UFC

disminuyó; tendencia caracterizada por un coeficiente de determinación alto (0.9376) y también un alto coeficiente de correlación (0,95).



**Gráfico 4-1. Análisis de regresión entre las Unidades Formadoras de colonias y el nivel de EHAPA sobre *Staphylococcus aureus*.**

El número de UFC<sup>-1</sup> de *E. coli*, en dependencia de las concentraciones de EHAPA, mostró una tendencia polinómica cuadrática negativa, la que se muestra en el Gráfico 4-2, ( $y = 144,26x^2 - 4060,9x + 29335$ ). La curva muestra que, a mayor concentración de EHAPA, el número de UFC disminuyó, lo que permite afirmar que a concentraciones del 60%, el grado de efectividad es mayor. La tendencia polinómica descrita mostró un coeficiente de determinación  $R^2 = 0.9.72$  y un coeficiente correlacional de 0,94 que indica una asociación positiva alta entre las variables sometidas al análisis de regresión.



**Gráfico 4-2. Análisis de regresión entre las Unidades Formadoras de colonias y niveles de EHAPA sobre *Escherichia coli*.**

#### **4.3. Evaluación de sensibilidad de bacterias ATCC® con EHAPA frente a antibióticos comerciales**

Las pruebas estadísticas partieron de la respuesta in vitro del microorganismo a un antibiótico comercial como al EHAPA, obteniendo los resultados que se exponen en la tabla 4-3, partiendo de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) la cual se define como Malbrán, (2012) la mínima concentración de un antimicrobiano que previene el desarrollo visible de un microorganismo en una prueba de sensibilidad por dilución en caldo o agar

La interpretación de resultados para el Extracto Hidro-alcohólico de propóleos de abejas el punto final se define como la concentración en la cual hay una reducción en el crecimiento > 80 % comparada con el control del crecimiento la cual se clasifica como sensible. Por otro lado, en cuanto a antibióticos comerciales, su lectura se encuentra bajo criterio de interpretación de

Malbrán. (2012), la cual se basa en el valor de Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) o el halo de inhibición bajo el criterio de interpretación, sensible, intermedio y resistente

**Tabla 4-3. Sensibilidad In vitro en *S. aureus* y *E. coli* ATCC® por efecto de EHAPA y antibióticos comerciales.**

Variables	Niveles de EHAPA				Antibióticos Comerciales	
	Concentración Mínima Inhibitoria %				Halo de inhibición (mm)	
	T1 (15%)	T2 (30%)	T3 (45%)	T4 (60%)	Penicilina	Oxi-Tetraciclina
<i>Staphylococcus aureus</i>	48,71**	69,98**	87,71***	95,62****	37,67***	26,33***
<i>Escherichia coli</i>	50,68**	73,58**	92,05***	96,32****	10,33*	20,33***

Interpretación:  
 \*\*\*= Sensible  
 \*\* = Intermedio  
 \* = Resistente

En ese mismo contexto la concentración Mínima Inhibitoria para el Extracto Hidroalcohólico de propóleos de Abeja fue  $\geq 80\%$ , adicionados 45% y 60 % dando como resultado la presencia de sensibilidad para cada uno de los tratamientos no obstante marcando un nivel de intermedio para 15% y 60% comparada con el tratamiento control.

Los datos obtenidos en el presente estudio reportan valores para el Extracto Hidroalcohólico de Propóleos Apícolas cercanos al 100% en su concentración mínima bactericida lo que indica que en el método utilizado en la elaboración del EHAPA favorece la extracción de los compuestos antibacterianos. De acuerdo con diferentes autores (Kujumgiev *et al.*, 1999; Sforcin *et al.*, 2000), citado por García *et al.* (2010), esta actividad antibacteriana de los propóleos es debida a la presencia de compuestos fenólicos, especialmente flavonoides, ácidos fenólicos y sus ésteres, en tal sentido la obtención de manera indiferente de extractos entre ellos el etanólico u acuoso, reportando resultados poco favorables para bacterias Gram negativas, lo que no sucedo con el presente estudio. Cabe recalcar no existe información sobre estudios con

Extracto Hidro-alcohólico de Propóleos Apícolas en Bacterias Causantes de Metritis por lo que se comparó con la de extractos de propóleo acuoso y Etanólicos.

En escenarios similares Galarza. (2013), reporta que el propóleo en si no tiene ningún efecto sobre la *Escherichia coli*, ya que los resultados de las medidas de los halos de inhibición fueron iguales a cero en concentraciones de 10% y 30%, corroborado por Carillo *et al.* (2011) en el cual las cepas bacterianas de tipo *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, mostraron menor susceptibilidad a los extractos acuosos que a los extractos Etanólicos concluyendo que los extractos Etanólicos tienen una mayor actividad antibacteriana en comparación con los extractos acuosos, estas estas diferencias se pueden atribuir a la forma de elaboración del extracto.

Por otro lado, los Halos de inhibición fueron  $\geq 20$  (mm) para Oxi-tetraciclina y Penicilina macando así sensibilidad a antibióticos antes mencionados, sobre bacterias causantes de Metritis a excepción de la *E. coli*  $\leq 14$  (mm) dando como resultado resistencia.

Dicho de otro modo, las bacterias *Staphylococcus*, presentaron sensibilidad para penicilina y Oxi-Tetraciclina resultado que es consistente con lo reportado por Russi. (2008), quien encontró sensibilidad de una cepa control frente a la penicilina, Bernal y Guzmán (1984) reportan que estas cepas tienen un patrón de sensibilidad ya conocido frente a los antimicrobianos, concordando con los datos obtenidos en el presente estudio.

De manera similar bacterias *Escherichia coli* presentaron sensibilidad a Oxi-Tetraciclina, no obstante, mostraron resistencia a la penicilina, de hecho, Lazo *et al.* (2013) menciona que la resistencia bacteriana, se debe a la aparición de bacterias cuyos mecanismos de defensa han creado resistencia frente a los antibióticos, con la consiguiente pérdida de acción de los mismos, dando como resultado la presencia de resistencia. Si comparamos con los resultados obtenidos mediante el estudio de antibióticos comerciales y de la utilización Extracto Hidro-alcohólico de Propóleos de Abejas este último presenta una alta sensibilidad lo cual permite exhortar el nivel de eficacia de producto en estudio.

En relación con diferentes estudios realizados reportan una composición del propóleo contiene cerca de 160 sustancias, de los cuales la mitad compuestos de origen fenólico, siendo estos últimos responsables de la acción farmacológica (Velásquez y Montenegro, 2017). En tal

sentido, se puede inferir basados en los presentes resultados, para causar un mayor efecto bactericida sobre la población bacteriana aislada, se requieren concentraciones elevadas de EHAPA (tabla 4-3), no obstante, se obtuvo un registro de sensibilidad tanto para bacterias *Staphylococcus aureus* como *Escherichia coli* en un ambiente controlado (In vitro).

#### 4.4. Proyección de Costo de Producción.

Dentro de los costos de elaboración del Extracto Hidroalcohólico de Propóleos de Abejas se reporta que elaborar 100 mililitros EHAPA representa un valor de 9,79 \$ como podemos observar en la Tabla 4-4. En base a este resultado podríamos decir que producir propóleos en las diferentes concentraciones 60%, 45%, 30% y 15% tendrá un valor de (5.87\$, 4.41\$, 2.94\$, 1.47\$) en el mismo orden, cabe recalcar que esta proyección en base a los 609 ml de extracto obtenidos dentro de la presente investigación obteniendo así una referencia del costo de producción.

**Tabla 4-4. Proyección de costo del Extracto Hidroalcohólico de propóleos de abejas**

INSUMO	CANTIDAD	UNIDAD	COSTO
Propóleo	100	gramos	5
Agua destilada	200	mililitros	0,19
Alcohol Potable	200	mililitros	1,03
Papel Filtro	2	laminas	2,68
Servicios básicos y usos de equipos	10	%	0,89
<b>TOTAL</b>			<b>9,79</b>

Realizado por: Leidy Alban, 2020

Equivale a un frasco de 100 ml de EHAPA

## CONCLUSIONES

- Se obtuvo EHAPA, siguiendo el procedimiento propuesto por Proaño et al., (2016) y se determinó que el efecto antibiótico del extracto alcohólico fue aditivo al del extracto hídrico, así, la técnica utilizada para la elaboración muestra un mayor aprovechamiento de los compuestos del propóleo a los que se le atribuye propiedades biológicas bactericidas.
- Se identificó que el principal principio activo de EHAPA son los fenoles parciales con una solubilidad (13,16 mg/ml en agua y 26,35 mg/ml en alcohol) que al combinarse se obtuvo 39,51 mg/ml. Estos resultados se deben a que no todos los compuestos fenólicos son solubles al agua, por lo que al utilizar dos tipos de solventes se mejora la calidad del producto.
- Se encontró una mejor respuesta antibacteriana con concentración al 60% dando resultados de inhibición bacteriana estadísticamente similares en *S. aureus* como en *E. coli*, demostrando que a medida que se incrementa la concentración disminuye la carga bacteriana.
- Se evidenció que las bacterias (*Staphylococcus aureus* y *E. coli*) fueron sensibles a Extracto Hidroalcohólico de Propóleos de Abejas y su mayor sensibilidad se presentó al 45% y 60%, presentando una Concentración Mínima Inhibitoria mayor al 80%, difiriendo así de los antibióticos comerciales quienes presentaron niveles de sensibilidad diferente. Se probó una superioridad antibacteriana de EHAPA frente al antibiótico comercial.

## RECOMENDACIONES

- Utilizar Extracto Hidro-alcohólico de Propóleos de Abejas, *In vivo* en vacas con problemas de metritis.
- Replicar este estudio, con otro tipo de bacterias Gram positivas y Gram negativas.
- Comparar el Extracto Hidro-alcohólico de Propóleos de Abejas con otro tipo de extractos de origen Natural.
- Realizar el análisis de cada uno de los componentes químicos del propóleos y su mecanismo de acción.

## **GLOSARIO**

**Antibiótico:** Sustancias químicas que los microorganismos que producen enfermedades e infecciones causadas por bacterias u hongos (Muñoz et al., 2004).

**In-vitro:** Se refiere a una técnica para realizar un determinado estudio en un ambiente controlado fuera de un organismo vivo (Malbrán, 2012).

**EHAPA:** Siglas que significan Extracto Hidroalcohólico de Propóleos de Abejas.

**Bacterias ATCC®:** Microorganismos certificados utilizados en diferentes disciplinas, para el control de calidad en microbiología (Montoya, s.f.)

**Pruebas de Sensibilidad:** Se usa para encontrar el tratamiento más eficaz contra una infección bacteriana su Categoría de interpretación es Sensible, intermedio, resistente, no Sensible (Malbrán, 2012).

**Concentración Mínima Inhibitoria:** mínima concentración de un antimicrobiano que previene el desarrollo visible de un microorganismo en una prueba de sensibilidad por dilución en caldo o agar (Malbrán, 2012, p. 4).

**Bactericida:** Sustancia que produce la muerte de una bacteria (Muñoz et al., 2004).

**Bacteriostáticos:** Es aquel que no destruye o mata las bacterias, pero si detiene su crecimiento, de tal manera que acaban muriendo sin reproducirse (Muñoz et al., 2004).

**Antibiograma:** Determinan la susceptibilidad de un microorganismo frente a los medicamentos antimicrobianos, a partir de la exposición de una concentración estandarizada del germen a estos fármacos (Bernal y Guzmán 1984).

**Sensidiscos:** Se utilizan para pruebas semicuantitativas de sensibilidad in vitro de patógenos bacterianos, Cada disco contiene una concentración predeterminada que permite una correlación más o menos precisa con la concentración mínima inhibitoria que dicho antibiótico (Bernal y Guzmán 1984).

**Mc Farland 0.5:** son utilizados como patrones de turbidez consiste básicamente en una serie de tubos estandarizados que contienen una suspensión de un precipitado fino que se asemejan a suspensiones bacterianas en opacidad (Fiallos, 2017, p.4)

## BIBLIOGRAFÍA

- Ang, J. Ezike, E. & Asmar, B. (2004). Antibacterial resistance. *Indian Journal Pediatrics*, 229–239. <https://doi.org/10.1007/BF02724275>
- Angulo, J. (2014). Caracterización y Actividad Antioxidante de Propóleos de Diferentes Zonas Apícolas de la Provincia de Chimborazo Utilizados en la Empresa Apicare -Riobamba [Tesis de Pregrado ESPOCH, Ecuador]- <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/3188/1/56T00426.pdf>
- Aquino, W y Arroyo, J. (2015). “Efecto Bactericida Delextracto Hidroalcohólico de Propóleos en Bacterias Grampositiva (*Staphylococcus aureus*) y Gramnegativa (*Salmonella typhi*) a Diferentes Concentraciones” [Tesis de Pregrado Universidad Nacional Del Centro Del Perú]. Repositorio institucional. <http://repositorio.unCP.edu.pe/bitstream/handle/UNCP/1931/Aquino%20Colachagua%20-%20Arroyo%20Cajacuri.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Arias, Y. (2018). Efecto antibacteriano in vitro del Propóleo, Hipoclorito de Sodio y Gluconato de Clorhexidina frente a *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus* [Tesis de pregrado Universidad Peruana de los Andes]. Repositorio Institucional. <http://repositorio.upla.edu.pe/handle/UPLA/1112>
- Avalos, T. (2014). *Determinación de la flora bacteriana aeróbica normal en vagina de vaquillas*. [tesis de pregrado]. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro- México. <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/4095/DETERMINACIONDELAFLORABACTERIANA AEROBICA NORMAL EN VAGINA DE VAQUILLAS.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Bankova, V. Popova, M. Bogdanov, S. Sabatini, AG. (2007). Chemical composition of European propolis of different geographic origin. *Revista Apidologie*, 38, 306– 311. DOI: 10.1051/apido:2007013
- Bauder, M. Kirby, M. Sherris, J. Turck, M.(1966). Pruebas de sensibilidad a antibióticos mediante un método de disco único estandarizado. *Journal of Clinical Pathology*.< 45(4), 493–496. [https://doi.org/10.1093/ajcp/45.4\\_ts.493](https://doi.org/10.1093/ajcp/45.4_ts.493).

- Bernal, M y Guzman, M. (1984). El Antibiograma de Discos. Técnica de Kirby-Bauer. *Revista BIOMEDICA*. 4 (3-4). DOI: <https://doi.org/10.7705/biomedica.v4i3-4.1891>
- Bondurant, R. (1999). Inflamación en el aparato reproductor femenino bovino. *Journal of Animal Science*. 77, 101-110. [https://doi.org/10.2527/1999.77suppl\\_2101x](https://doi.org/10.2527/1999.77suppl_2101x)
- Borie Polanco, C., Agüero Eguiluz, H., Morales, M., Kruze, J., León, B. y San Martín Núñez, B. (2004). Etiología de metritis bovina en rebaños lecheros de las Regiones V y Metropolitana (Chile) y resistencia bacteriana frente a diferentes antimicrobianos. Disponible en <http://repositorio.uchile.cl/handle/2250/122546>
- Bucio, C y Martínez, O., (2016). Actividad antibacteriana de un extracto acuoso de propóleo del municipio de Irapuato, Guanajuato, México. *Agronomía Mesoamericana*, vol. 28(1), 223-227. <https://www.redalyc.org/jatsRepo/437/43748637018/html/index.html>
- Cabrera, C. Gómez, R. Zúñiga, A. (2007). La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. *Revista, Colombia Médica*. 38(2), 149-158. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=28338208>
- Calvo, J y Martinez, L. (2009). *Mecanismos de acción de los antimicrobianos*. Servicio de Microbiología, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander, España. [http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:\\_Hd87II1PMMJ:www.sld.cu/galerias/doc/sitios/apua-cuba/mecanismos de accion de los antimicrobianos.doc+&cd=1&hl=es&ct=clnk&gI=ec&client=firefox-b-d](http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:_Hd87II1PMMJ:www.sld.cu/galerias/doc/sitios/apua-cuba/mecanismos+de+accion+de+los+antimicrobianos.doc+&cd=1&hl=es&ct=clnk&gI=ec&client=firefox-b-d)
- Canet, J. (2016, Enero, 19). *Escherichia Coli: características, patogenicidad y prevención* (I). <http://www.betelgeux.es/blog/2016/01/19/escherichia-coli-caracteristicas-patogenicidad-y-prevencion-i/>
- Cantón, R. (2010). Lectura interpretada del antibiograma: una necesidad clínica. *Revista, Elsevier*, 28 (6), 375-385. <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-lectura-interpretada-del-antibiograma-una-S0213005X1000087X>

- Carrillo, M. Castillo, L y Mauricio, R. (2011). Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de Extractos de Propóleos de la Huasteca Potosina (México). *Revista Información Tecnológica*. 22(5), 21-28. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642011000500004>
- Cayul, A. (2003). *Estudio de resistencia a antimicrobianos de uso frecuente en Medicina Veterinaria, de patógenos bacterianos aislados me metritis Bovina en rebaños lecheros de la décima región*. [Tesis de pregrado]. Universidad Austral de Chile - Chile. <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2003/fvc385e/doc/fvc385e.pdf>.
- Cervantes, E. García, R. Salazar-Schettino, P. (2014). Características generales del *Staphylococcus aureus*. *Revista Mexicana Patología Clínica Medicina Laboratorio*. 61(1), 28-40. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=48300>
- Cruz, L. (2009). *Eficiencia Reproductiva de Vacas Holstein con Metritis tratadas con Cefalosporinas y Oxitetraciclina*. [tesis de pregrado]. Universidad San Francisco De Quito, Ecuador. <http://repositorio.usfq.edu.ec/bitstream/23000/873/1/93528.pdf>
- Davidson, J. Wright, D. Archbald, F. Klapstein, E. Gottshall, S. y Hanse, P. (1996). Effect of induced pyometra on luteal lifespan and uterine fluid concentrations of prostaglandins and interferons in cows. *Revista, Theriogenology*. 45, 459-470. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(95\)00382-I](https://doi.org/10.1016/0093-691X(95)00382-I)
- [De la Fuente, N. Villarreal, J. Díaz, M. y García, A. \(2015\). Evaluación de la actividad de los agentes antimicrobianos ante el desafío de la resistencia bacteriana. \*Revista mexicana de ciencias farmacéuticas\*. 46\(2\), 7-16. \[http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\\_arttext&pid=S1870-01952015000200007&lng=es&tlng=es\]\(http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\_arttext&pid=S1870-01952015000200007&lng=es&tlng=es\)](#)
- Farré, R. Frasset, I. Sánchez, A. (2004). El própolis y la salud. *Revistas de la Universidad de Granada*., 45, (1), 21-43. <https://revistaseug.ugr.es/index.php/ars/article/view/5105/0>

- Fernández, A. Silveira, E y López, O. (2006). Las infecciones uterinas en la hembra bovina. *Revista Electrónica de Veterinaria REDVET*, 7 (10), 1-3. <https://www.redalyc.org/pdf/636/63617167007.pdf>
- Fiallos, J (2017) Determinación de la correlación entre Métodos Visuales, Ópticos y Difusión en placa en el Crecimiento de *Escherichia coli*. [Tesis de Pregrado UTA, Ecuador]. <https://repositorio.uta.edu.ec/bitstream/123456789/26334/1/BQ%20135.pdf>
- Galarza, L. (2013). *Determinación del poder antibiótico in vitro del extracto etanólico de propóleo sobre Staphylococcus aureus y Escherichia coli presentes en Metritis puerperal bovina*. [Tesis posgrado]. Universidad de Cuenca- Ecuador. <http://dspace.ucuenca.edu.ec/jspui/bitstream/123456789/538/1/Tesis.pdf>
- García, E. Fernández, I y Fuentes, A. (2015). Determinación de polifenoles totales por el método de Folin-Ciocalteu. *Artículo Docente, Universitat Politècnica de València*. <http://hdl.handle.net/10251/52056>
- García, Lady. Martínez, J. García, C. Gil, J y Durango D. (2010). Caracterización Físicoquímica y Actividad Antimicrobiana del Propóleos en el Municipio de La Unión (Antioquia, Colombia). *Revista Facultad Nacional de Agronomía - Medellín*, 63(1),5373-5383. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=179914617015>
- Gómez, L. Silveira E. (2006). La leucorrea vaginal bovina de carácter no inflamatorio y su significación clínica. *Revista Electrónica de Veterinaria*, 7(10), 1-29. <https://www.redalyc.org/pdf/636/63617167008.pdf>
- Guaraca, A. Palomino, D. (2016). *Estudio de la composición química y actividad antibacteriana de muestras de propóleos de diferente localización geográfica*. [tesis de posgrado]. Universidad Politécnica Salesiana, Cuenca –Ecuador. <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/15371/1/UPS-CT007559.pdf>
- Herrera, A. (2013). *Problemas reproductivos en bovinos*. (tesis de pregrado). Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”. <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/7394/ANTONIO%20HERRERA%20HERNANDEZ.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

- Horna, G. Silva, M. Vicente, W. Tamariz, J. (2005). Concentración mínima inhibitoria y concentración mínima bactericida de ciprofloxacina en bacterias uropatógenas aisladas en el Instituto Nacional de Enfermedades Neoplásicas. *Revista Medica Herediana*. 16 (1). [http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1018-130X2005000100007](http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1018-130X2005000100007)
- Huaytalla Alemán, Richard M, Gálvez Ramírez, Carlos M, Carhuapoma-Yance, Mario, Alvarez-Paucar, María A, & López Guerra, Sofía. (2018). Efecto inhibitor in vitro del extracto etanólico de propóleo al 15% y 30% frente a cepas de *Lactobacillus acidophilus*. *Revista Estomatológica Herediana*, 28(1), 36-43. <https://dx.doi.org/https://doi.org/10.20453/reh.v28i1.3281>
- Hussain, A. Daniel, R. O'Boyle, D. (1990). Postpartum uterine flora following normal and abnormal puerperium in cows. *Revista. Theriogenology*.34, 291-302. DOI: [10.1016/0093-691x\(90\)90522-u](https://doi.org/10.1016/0093-691x(90)90522-u)
- Jaureguiberry, M. Madoz, L. y De la Sota, R. (2015). Actualización en el síndrome de vaca repetidora. *Revista Tauro*. 17(65), 14-19. <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/57041>
- Laboratorio de biotecnología y Microbiología Animal. (2021). Ficha Técnica, Facultad de Ciencias Pecuarias, Espoch.
- Laboratorio de Nutrición Animal y Bromatología. (2021). Ficha Técnica, Facultad de Ciencias Pecuarias, Espoch.
- Laboratorio Química Orgánica. (2021). Ficha Técnica, Facultad de Ciencias Químicas, Espoch.
- Lazo, G. Flores, E. Vargas, L y Camacho, A. (2013). Sensibilidad y resistencia en el antibiograma del *Staphylococcus aureus* en pacientes del Hospital Clinico Viedma *Revista Científica Ciencia Medica*. 16(2), 15-17. [http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1817-74332013000200005](http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1817-74332013000200005)
- LeBlanc, S. (2018). Postpartum uterine disease and dairy herd reproductive performance. *The Veterinary Journal*. 176, 102-114. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1090023307004273?via%3Dihub>

- López, E. (2015). Estudio de la actividad antimicrobiana y antioxidante de propóleos de distintos orígenes. [Tesis de pregrado Universidad Politécnica de Valencia]. [https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/54188/TFG\\_Elias3.1\\_14362651275206213081138792609195.pdf?sequence=1](https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/54188/TFG_Elias3.1_14362651275206213081138792609195.pdf?sequence=1)
- Malbrán, C. (2012 junio). *Método de Determinación de Sensibilidad Antimicrobiana por Dilución*. <http://antimicrobianos.com.ar/ATB/wp-content/uploads/2012/11/04-DETERMINACION-DE-LA-SENSIBILIDAD-METODO-DE-DILUCION-2012.pdf>
- Méndez, D. (2008, julio, 31). *Determinación de la microflora bacteriana uterina en vacas donantes de embriones*. [Tesis De Pregrado]. Pontificia Universidad Javeriana-Bogotá.. <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8288/tesis119.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Montenegro, M. (2015 julio, 26). *Enfermedades uterinas en vacas lecheras*. Clínica de Animales mayores, Facultad de Medicina Veterinaria-Universidad Nacional Mayor de San Marcos. [https://www.agrovetmarket.com/resources/investigacion\\_y\\_desarrollo/articulos\\_tecnicos/5\\_enfermedades\\_uterinas\\_espanol\\_c69ec2f627.pdf](https://www.agrovetmarket.com/resources/investigacion_y_desarrollo/articulos_tecnicos/5_enfermedades_uterinas_espanol_c69ec2f627.pdf)
- Montoya, M. (s.f.). Las cepas atcc. [Mensaje en un blog]. <https://www.monografias.com/docs/Las-cepas-atcc-P3S7WJK6L9JF>
- Morales, E. (2012). *Utilización de prostaglandinas en el tratamiento de Metritis en Bovinos*".[tesis de pregrado]. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo – Ecuador. <http://dspace.esPOCH.edu.ec/bitstream/123456789/2103/1/17T1104.pdf>
- Muñoz, L. Linares, S. y Narvárez, W. (2011). Propiedades del Propóleo como Aditivo Natural Funcional en la Nutrición Animal. *Biosalud*, 10(2), 101-111. [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1657-95502011000200010&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1657-95502011000200010&lng=en&tlng=es).
- Muñoz, D. Arango, A. y Jaramillo, F. (2004). Los antibióticos y su situación actual. *Revista Vitae*, 11(1),21-33. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=169818259003>

- Nápoles, M. Martínez, J. Costales, D. Gómez, G. y Somers, E. (2006). *Efecto de diferentes medios de cultivo en la multiplicación celular de Bradyrhizobium elkanii*. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=1932/193215885006>
- Nodarse, R. (2013). Lectura interpretada del antibiograma. *Revista Cubana de Medicina Militar*. 42 (4). [http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0138-65572013000400012&script=sci\\_arttext&tlng=pt](http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S0138-65572013000400012&script=sci_arttext&tlng=pt)
- Ortega, N. Campo, N. y Fajardo, F. (2011 marzo 16). *Actividad antibacteriana y composición cualitativa de los propóleos provenientes de dos zonas climáticas del departamento del cauca*. Artículo de investigación científica y tecnología. 9(1), 8-16. <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v9n1/v9n1a02.pdf>
- Paisley, L. Mickelsen, W y Anderson, P.(1986). Mechanisms and therapy for retained fetal membranes and uterine infections of cows: a review. *Revista, Theriogenology*. 25. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(86\)90045-2](https://doi.org/10.1016/0093-691X(86)90045-2)
- Palmer, C. (2007 junio 31). Metritis Postparto en Vacas Lecheras. *Agrovet Market Animal Health* <https://www.agrovetmarket.com/investigacion-salud-animal/pdf-download/metritis-postparto-en-vacas-lecheras>
- Palomino, L. (2009). Caracterización Físicoquímica y Evaluación de la Actividad Antioxidante de Propóleos de Antioquia. [ *Tesis de Maestría, Universidad Nacional De Colombia Sede Medellín*]. <https://core.ac.uk/download/pdf/11051122.pdf>
- Pérez, J. (2012 noviembre 12). Enfermedad uterina en vacas. *Medicina Veterinaria al Día* [https://www.researchgate.net/publication/257820829\\_ENFERMEDAD\\_UTERINA\\_EN\\_VACAS](https://www.researchgate.net/publication/257820829_ENFERMEDAD_UTERINA_EN_VACAS)
- Polaino, C. (ED). (2006). *Manual Práctico del Apicultor, Madrid, España, Editorial Cultural*.
- Principal, J. Barrios, C. Pacheco, N. Corrales, F y Moreno F. (2005). Actividad antibacteriana invitro del extracto etanólico de propoleo sobre una sepa de Staphylococcus aureus. *Revista Caseta de ciencias Veterinarias*. 11(1),31-36. <http://www.ucla.edu.ve/dveterin/departamentos/CienciasBasicas/gcv/2530int2530er2530no/articulos/documasp/~keh3d2oa.pdf>

- Proaño, F. Flores, L. Granizo, I. y Rodríguez, J. (2016). Determinación del valor antibiótico de los propóleos apícolas en el control de metritis bovina. *Revista ciencia y Agricultura (Rev. Cien. Agri.)*. 13 (2). 141-150. <https://es.scribd.com/document/408318578/Rev-CienciayAgricultura-Vol13-2-Completa-pdf>
- Rojas, A. (2011, Agosto 03 ). Conceptos y práctica de microbiología, manual de microbiología. *Universidad Nacional de Colombia*. <http://bdigital.unal.edu.co/4999/1/albertorojastrivino.2011.pdf>
- Russi, N. (2008). *Susceptibilidad a Antibioticos de Staphylococcus Aureus aislados de Mastitis Bovina* [Tesis de Maestria Universidad Nacional Del Litoral]. Repositorio institucional. <https://bibliotecavirtual.unl.edu.ar:8443/bitstream/handle/11185/259/tesis.pdf?sequence=1>
- Salmón, V. (2014). El Propóleo, otro recurso terapéutico en la práctica clínica. *Curso de adaptación al grado, Universidad de Cantabria*. <https://repositorio.unican.es/xmlui/bitstream/handle/10902/5580/NoriegaSalmonV.pdf>
- Sánchez, E. Núñez, D. Cruz, R., Torres, M, Herrera, E. (2017). Simulación y Conteo de Unidades Formadoras de Colonias. *Revista electrónica de Computación, Informática, Biomédica y Electrónica*. 6(1). 97-111. <https://www.redalyc.org/journal/5122/512253717006/html/>
- Sánchez, M. González, C. Castañeda, R. Guáqueta, H. Aranda, M. Rueda, M. (2011). Evaluación citológica y microbiológica de lavados uterinos en bovinos con problemas reproductivos. *Revista MVZ Córdoba*. 16, 2711-2720. <https://www.redalyc.org/pdf/693/69322399008.pdf>
- Sánchez, O. García, J. y Hernández, M. (2017) Comparación entre la aortopunción y el tratamiento intrauterino en la metritis puerperal en vacas lecheras. *Revista Electrónica de Veterinaria*. 18, 1-7. <https://www.redalyc.org/pdf/636/63649684013.pdf>
- Shahbaz, M. Zahoor, T. Muhammad, A. y Nawaz. H (2015). Vitro Antibacterial Activity of Hydroalcoholic Extract of Propolis against Pathogenic Bacteria. *Pakistan Journal of Life and Social*. 132. [http://www.pjlss.edu.pk/pdf\\_files/2015\\_3/132-136.pdf](http://www.pjlss.edu.pk/pdf_files/2015_3/132-136.pdf)

- Sheldon M. (2004). The postpartumuterus. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 20, 569-591  
doi: 10.1016/j.cvfa.2004.06.008
- Sheldon, M. (2006). Defining postpartum uterine disease in cattle. *Revista. Theriogenology.* 65  
(8), 1516-1530. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.08.021>
- Silva, J. Rodrigues, S. Feás, X Y Estevinho, L. (2012). Antimicrobial activity, phenolic profile and role in the inflammation of propolisJoão Carlos Silvaa, Sandra Rodriguesa,b, Xesús Feásc, Leticia M. Estevinho. *journal Food and Chemical Toxicology*, (50).  
[https://core.ac.uk/reader/153411022?utm\\_source=linkout](https://core.ac.uk/reader/153411022?utm_source=linkout)
- Siripatrawan, Ubonrat & Vitchayakitti, Waranya & Sanguandeeul, Romanee. (2013). Antioxidant and antimicrobial properties of Thai propolis extracted using ethanol aqueous solution. *International Journal of Food Science & Technology.* 48.  
10.1111/j.1365-2621.2012.03152.x.
- Torres, E. Nakao, T. Hiramune, T. Moriyoshi, M. Kawana, K. y Nakada, K. (1997). Stress and Uterine Bacterial Flora in Dairy Cows Following Clinically Normal and Abnormal Puerperium. *Journal of Reproduction and Development.* 43(2). DOI [10.1262/jrd.43.157](https://doi.org/10.1262/jrd.43.157)
- Tovalino, M. Frank, R y Sacsquispe, S. (2010). Evaluación in vitro del efecto antibacteriano del extracto etanólico de propóleo de Oxapampa - Perú sobre cultivos de Streptococcus mutans (ATCC 25175) yStaphylococcus aureus (ATCC 25923). *Revista Estomatológica Herediana.* 20, 19-24. <https://www.redalyc.org/pdf/4215/421539355004.pdf>
- Vargas, R. (2010). Capacidad Antioxidante y Antimicrobiana de los Propóleos En Hamburguesas de Bovino. [Tesis de Maestria, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C, Sonora].  
<https://ciad.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1006/395/1/VARGAS-SANCHEZ-RD10.pdf>
- Velasquez, B y Montenegro, S. (2017). Actividad antimicrobiana de extractos etanólicos de propóleos obtenidos de abejas Apis mellifera. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental.* 8(1). 185-193.  
[https://www.researchgate.net/publication/327000473\\_Actividad\\_antimicrobiana\\_de\\_e](https://www.researchgate.net/publication/327000473_Actividad_antimicrobiana_de_e)

[xtractos\\_etanolicos\\_de\\_propoleos\\_obtenidos\\_de\\_abejas\\_Apis\\_mellifera/fulltext/5b7238e7a6fdcc87df749825/Actividad-antimicrobiana-de-extractos-etanolicos-de-propoleos-obtenidos-de-abejas-Apis-mellifera.pdf](https://www.researchgate.net/publication/279449521_Antibacterial_Activity_of_Propolis_Ethanol_Extract_against_Antibiotic_Resistance_Bacteria_Isolated_from_Burn_Wound_Infections)

Zeighampour, F. Mohammadi-Sichani, M. Shams, E y Naghavi, N. (2013). Antibacterial activity of propolis ethanolic extract against antibiotic resistance bacteria isolated from burn wound infections. Zehedan. *Journal of Research in Medical Sciences*. 16, 25-30. [https://www.researchgate.net/publication/279449521\\_Antibacterial\\_Activity\\_of\\_Propolis\\_Ethanol\\_Extract\\_against\\_Antibiotic\\_Resistance\\_Bacteria\\_Isolated\\_from\\_Burn\\_Wound\\_Infections](https://www.researchgate.net/publication/279449521_Antibacterial_Activity_of_Propolis_Ethanol_Extract_against_Antibiotic_Resistance_Bacteria_Isolated_from_Burn_Wound_Infections)

Zendejas, G. Avalos, H. y Soto, M. (2014). Microbiología general de Staphylococcus aureus: Generalidades, patogenicidad y métodos de identificación. *Revista Biomédica*. 25(3), 129-143. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=53414>

## ANEXOS

### Anexo A. Rendimientos de 3 réplicas de Extracto Hidro-alcohólico de propóleo de Abeja

Agua destilada					
	Propóleo (g)	Agua destilada (g) (400ml)	Sólido (cera, g)	Gramos de liquido	ms sobrante
T1	200	377	3,31	227	259
T2	200	377	2,49	237	263
T3	200	377	1,73	212	264

Alcohol potable					
	Propóleo (g)	Alcohol potable (g) (400ml)	Sólido (cera, g)	Gramos de liquido	ms sobrante
T1	259	306	-	266	211
T2	259	306	-	230	206
T3	259	306	-	255	201

ROTAVAPOR	
Replica	Extracto obtenido (ml)
T1	201
T2	192
T3	216
Total	609

## Anexo B. Halo de inhibición de antibióticos en *Staphylococcus aureus*

### A. Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	192,67	1	192,67	578,00	<0,0001
tratamiento	192,67	1	192,67	578,00	<0,0001
Error	1,33	4	0,33		
Total	194,00	5			

### B. Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 0,3333 gl: 4

tratamiento	Medias	n	E.E.	
Penicilina	37,67	3	0,33	A
Oxi-Tetraciclina	26,33	3	0,33	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## Anexo C. Halo de inhibición de antibióticos en *Escherichia coli*

### A. Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	150,00	1	150,00	180,00	0,0002
tratamiento	150,00	1	150,00	180,00	0,0002
Error	3,33	4	0,83		
Total	153,33	5			

### B. Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 0,8333 gl: 4

tratamiento	Medias	n	E.E.	
Oxi-Tetraciclina	20,33	3	0,53	A
Penicilina	10,33	3	0,53	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## Anexo D. Nivel de eficacia curativa de EHAPA en *Staphylococcus aureus*

### A. Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	954622175,33	4	238655543,83	1810,07	<0,0001
TRATAMIENTOS	954622175,33	4	238655543,83	1810,07	<0,0001
Error	1318488,00	10	131848,80		
Total	955940663,33	14			

### B. Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 131848,8000 gl: 10

TRATAMIENTOS	Medias	n	E.E.	
Testigo (0%)	23302,67	3	209,64	A
T1 (15%) EHAPA	12073,33	3	209,64	B
T2 (30%) EHAPA	7065,00	3	209,64	C
T3 (45%) EHAPA	2892,00	3	209,64	D
T4 (60%) EHAPA	1030,33	3	209,64	E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## Anexo E. Nivel de eficacia curativa de EHAPA en *Escherichia coli*

### A. Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1007504257,07	4	251876064,27	1343,71	<0,0001
TRATAMIENTOS	1007504257,07	4	251876064,27	1343,71	<0,0001
Error	1874482,67	10	187448,27		
Total	1009378739,73	14			

### B. Test:Duncan Alfa=0,05

Error: 187448,2667 gl: 10

TRATAMIENTOS	Medias	n	E.E.	
Testigo (0%)	23302,67	3	249,97	A
T1 (15%) EHAPA	11609,00	3	249,97	B
T2 (30%) EHAPA	6218,33	3	249,97	C
T3 (45%) EHAPA	1871,67	3	249,97	D
T4 (60%) EHAPA	865,67	3	249,97	E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## Anexo F. Proceso de Elaboración del Extracto Hidro-alcohólico de Propóleos de Abeja



**Triturado**



**Pesaje**



**Aforo con agua destilada y Alcohol Potable**



**Baño María**



**Separacion de solidos**



**Solidos y liquidos obtenidos**



**Filtrado al vacio**



**Eliminación de alcohol (Rotavapor)**



**Producto final extracto hidroalcoholico de propoleos de abejas**

## Anexo G. Preparación de medios de cultivo y dilución de bacterias *S. aureus* y *E. coli*



## Preparación de medios de cultivo con Plate count agar y Muller Hinton



Dilución bacteriana

## Anexo H. Inoculación de Bacterias y aplicación de antibióticos comerciales



Siembra de bacterias ATCC

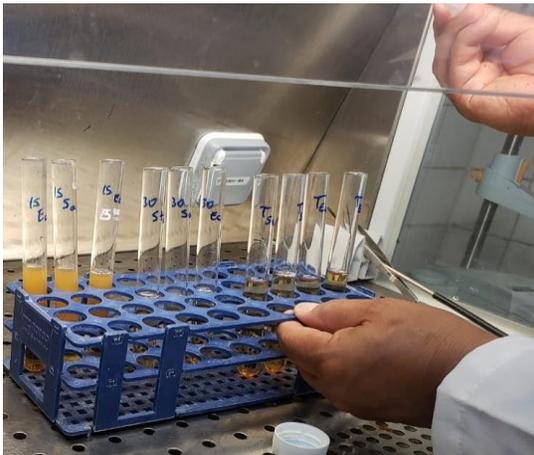


Colocación de sensidiscos  
(penicilina y oxi-tetraciclina)

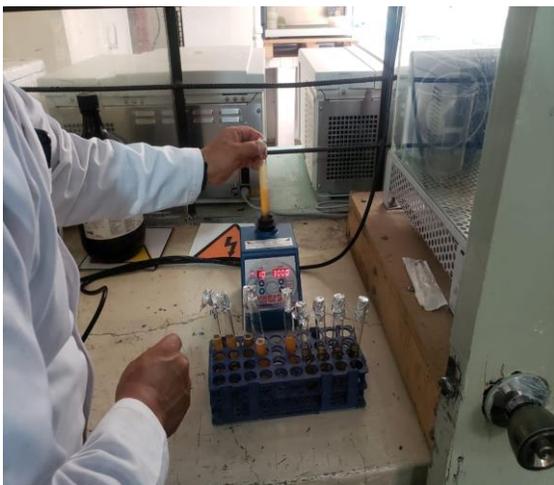
## Anexo I. Inoculación de Bacterias y aplicación de EHAPA.



**Dilución de la concentración bacteriana**



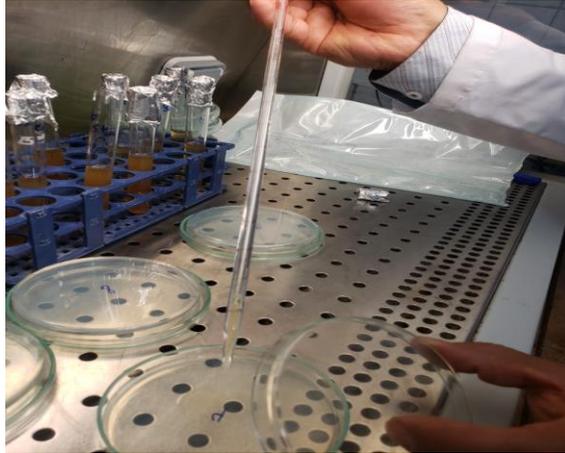
**Colocación de EHAPA**



**Agitación magnética**



**Preparación del medio de cultivo**



**Siembra del inóculo de cada uno de los tubos con los diferentes tratamientos**



**Resultado sin EHAPA**



**Resultado con EHAPA**



LEIDY ALBAN MORETA <leidyamarylisalbanmoreta@gmail.com>

---

## TRADUCCION

---

**Erika Elizabeth Yamasque Martinez** <erika.yamasque@epoch.edu.ec>

2 de octubre de 2022, 20:16

Para: "leidyamarylisalbanmoreta@gmail.com" <leidyamarylisalbanmoreta@gmail.com>, Centro de Idiomas <idiomas@epoch.edu.ec>

Reciba un atento y saludo.

Envió lo solicitado.

Atentamente,

*Master. Erika Yamasque*



**MORETA LEIDY Translated by Erika Yamasque 1-9-2022.docx**

15K [Visualizar como HTML](#) [Descargar](#)



esPOCH

Dirección de Bibliotecas y  
Recursos del Aprendizaje

UNIDAD DE PROCESOS TÉCNICOS Y ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO Y  
DOCUMENTAL

REVISIÓN DE NORMAS TÉCNICAS, RESUMEN Y BIBLIOGRAFÍA

Fecha de entrega: 26 / 10 / 2022

<b>INFORMACIÓN DEL AUTOR/A (S)</b>
<b>Nombres – Apellidos:</b> <i>Leidy Amarilis Alban Moreta</i>
<b>INFORMACIÓN INSTITUCIONAL</b>
<i>Instituto de Posgrado y Educación Continua</i>
<b>Título a optar:</b> <i>Magíster en Reproducción Animal mención Reproducción Bovina</i>
<b>f. Analista de Biblioteca responsable:</b> Lic. Luis Caminos Vargas Mgs.



Firmado electrónicamente por:  
LUIS ALBERTOCAMINOS VARGAS



0132-DBRA-UTP-IPEC-2022