

UCUENCA

Universidad de Cuenca

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia

Determinación de la actividad bacteriana y antifúngica *in vitro* del propóleo proveniente de tres regiones ecuatorianas

Trabajo de titulación previo a la
obtención del título de
Médico Veterinario Zootecnista

Autor:

Elisa Carolina Gomezcoello Calderón

Emanuel Medardo Sangurima Paute

Director:

Luis Rodrigo Galarza Álvarez

ORCID: 0000-0002-5856-156X

Cuenca, Ecuador

2023-02-13

Resumen

El uso indiscriminado de antimicrobianos en animales ha provocado una creciente resistencia antimicrobiana, el uso alternativo de propóleo es eficaz contra microorganismos resistentes debido a sus componentes flavonoides y fenólicos. El objetivo fue determinar la actividad antibacteriana y antifúngica *in vitro* del propóleo proveniente de tres regiones ecuatorianas (Costa, Sierra y Oriente). Inicialmente, se preparó el extracto etanólico de propóleo (EEP) al 20% de cada región. Los microorganismos *Staphylococcus aureus* y *Malassezia spp.*, fueron identificados, aislados y cultivados *in vitro* de pacientes caninos con otitis. Este estudio incluyó dos experimentos cada uno con 5 tratamientos y 7 repeticiones: EEP-Costa, EEP-Sierra, EEP-Oriente, antimicrobiano (gentamicina o fluconazol) y control (alcohol). El efecto de cada tratamiento fue valorado en halos de inhibición de antibiogramas (Experimento 1) y antifungigramas (Experimento 2). En el experimento 1, la gentamicina produjo mayor ($P < 0,01$) halo de inhibición ($25,2 \pm 0,46$ mm). Pero, los tratamientos de EEP produjeron mayores ($P < 0,01$) halos de inhibición que el control, obteniendo mejores resultados el EEP-Oriente con mayor ($P < 0,01$) halo de inhibición ($23,2 \pm 0,43$ mm). En el experimento 2, todos los EEP produjeron mayores ($P < 0,01$) halos de inhibición que el fluconazol y control. No obstante, el mejor tratamiento fue el EEP-Sierra con mayor ($P < 0,01$) halo de inhibición ($26,1 \pm 0,45$ mm). En conclusión, el EEP ecuatoriano al 20% ejerce eficazmente su acción antibiótica y antifúngica. Además, el EEP-Sierra y EEP-Oriente produjeron mejores efectos antimicrobianos que el EEP-Costa. Por ello, recomendamos validar estos efectos antimicrobianos *in vivo*, en pacientes con infecciones locales.

Palabras clave: propóleo, antibacteriano, antifúngico, otitis canina, Ecuador

Abstract

The indiscriminate use of antimicrobials in animals caused a growing antimicrobial resistance, the alternative use of propolis is effective against resistant microorganisms because it has flavonoids and phenolic components. The objective was to determine the antibacterial and antifungal activity *in vitro* of propolis coming from three Ecuadorian regions (Costa, Sierra and Oriente). Initially, we prepared the ethanol extract of propolis (EEP) to 20% of each region. The microorganisms *Staphylococcus aureus* and *Malassezia spp.*, were identified, isolated and cropped *in vitro* of canine otitis patients. This study has two experiments each one had 5 treatments and 7 repetitions: EEP-Costa, EEP-Sierra, EEP-Oriente, antimicrobial (gentamicin or fluconazole) and control (alcohol). The effect of each treatment was valued in halos of inhibition of antibiogram (Experiment 1) and antifungigram (Experiment 2). In the experiment 1, gentamicin produced major ($P < 0,01$) halo of inhibition ($25,2 \pm 0,46$ mm). But, the treatments of EEP produced major ($P < 0,01$) halos of inhibition against the control, getting the best results the EEP-Oriente with the major ($P < 0,01$) halo of inhibition ($23,2 \pm 0,43$ mm). In the experiment 2, all the EEP produced major ($P < 0,01$) halos of inhibition against the fluconazole and control. Nevertheless, the best treatment was the EEP-Sierra with major ($P < 0,01$) halo of inhibition ($26,1 \pm 0,45$ mm). In conclusion, the Ecuadorian EEP to 20% performs effectively its antibiotic and antifungal action. In addition, the EEP-Sierra and EEP-Oriente produced best antimicrobial effects than the EEP-Costa. Therefore, the recommendation is to validate this antimicrobial effects *in vivo* in patients with local infections.

Keywords: propolis, antibacterial, antifungal, canine otitis, Ecuador

Índice

Resumen	2
Abstract	3
Índice de figuras	6
Índice de tablas	7
Índice de anexos	8
Abreviaturas	13
1. Introducción	14
2. Objetivos	16
2.1.1. Objetivo General.....	16
2.1.2. Objetivos Específicos.....	16
3. Hipótesis	16
4. Revisión de literatura	17
4.1. Propóleo.....	17
4.1.1. Origen e historia del propóleo	17
4.1.2. Origen Botánico	17
4.1.3. Características físicas del propóleo	19
4.1.4. Composición química del propóleo.....	20
4.1.5. Extracto etanólico de propóleo	21
4.1.6. Aplicación del propóleo	21
4.1.7. Efectos adversos.....	25
4.2. Otitis.....	25
4.2.1. Generalidades.....	25
4.2.2. Etiología	25
4.2.3. Patogenia.....	28
4.2.4. Signos clínicos	28
4.2.5. Métodos de diagnóstico	28
4.2.6. Tratamiento.....	30
4.2.7. Complicaciones terapéuticas.....	32
4.2.7.1. Resistencia antibacteriana.....	33
4.2.7.2. Resistencia antifúngica.....	33

5. Materiales y Métodos	34
5.1. Materiales.....	34
a. Materiales Biológicos	34
b. Materiales Químicos.....	34
c. Materiales Físicos	34
d. Materiales de Laboratorio.....	35
5.2. Métodos	35
5.2.1. Área de estudio	35
5.2.2. Ubicación política - geográfica	36
5.2.3. Diseño experimental.....	36
5.2.4. Metodología para la investigación experimental	37
5.2.5. Análisis estadístico.....	41
6. Resultados	42
6.1. Primer experimento (bacterias): Halos de inhibición	42
6.2. Segundo experimento (Hongos): Halos de inhibición	43
7. Discusión	44
8. Conclusiones	47
9. Recomendaciones	48
Referencias	49
Anexos	58

Índice de figuras

Figura 1: Propóleo recién cosechado.	18
Figura 2: Ubicación política – geográfica del lugar	35
Figura 3: Procedimiento para realizar la tinción de Gram	38
Figura 4: Procedimiento para realizar la tinción con azul de Lactofenol.....	40
Figura 5: Efecto del extracto etanólico de propóleo de tres regiones ecuatorianas sobre el crecimiento de la bacteria <i>Staphylococcus aureus</i>	42
Figura 6: Efecto del extracto etanólico de propóleo de tres regiones ecuatorianas sobre el crecimiento del hongo <i>Malassezia spp.</i>	43

Índice de tablas

Tabla 1. Compuestos identificados en muestras de propóleo ecuatoriano	19
Tabla 2. Composición química del propóleo.....	20
Tabla 3. Factores primarios de otitis externa.....	27

Índice de anexos

Anexo A: Pacientes.....	58
Anexo B: Historias Clínicas	59
Anexo C: Recolección de muestras.....	63
Anexo D: Elaboración de los extractos etanólicos de propóleo.....	64
Anexo E: Elaboración de los medios de cultivos.....	65
Anexo F: Cultivos Bacterianos.....	66
Anexo G: Cultivos Fúngicos	67
Anexo H: Antibiogramas.....	68
Anexo I: Antifungigramas	70

Agradecimientos

Agradezco a Dios por darme un día más de vida y permitirme continuar día tras día con las metas que me he planteado, agradezco a mis padres, tío, abuela por apoyarme y ser un pilar en mi crecimiento profesional y personal, y sobre todo agradezco a mi fiel amiga y compañera Panchita que siempre ha estado para mí, acompañándome en cada momento, en cada noche de desvelo estudiando, y en cada lugar, por último cito una frase anónima que dice “No conozco la receta de la felicidad pero de seguro incluye un perro”, así que; muchas gracias Panchita por cada día hacerme feliz e impulsarme a ser una mejor persona y mejor médico veterinario zootecnista y salvar muchas vidas animales.

Agradezco a todos mis profesores de la universidad por haberme enseñado y compartido muchas experiencias enriquecedoras que me ayudarán a ser una mejor profesional.

También agradezco a mis compañeros y amigos que me han ayudado a llegar a la meta anhelada, a mi director de tesis, y profesores revisores de la misma por ayudarme a realizar este trabajo.

Muchas gracias a todos por ser parte de este proceso de mi vida.

Elisa Gomezcoello C.

Agradecimientos

Agradezco a mis padres María y Manuel por ser una clave fundamental en mi vida, mediante su apoyo y consejos he logrado cumplir esta etapa de mi vida. A mis hermanos Fabián, Catalina, Verónica y Eliceth que han estado de forma incondicional en mis momentos de estudio, siempre me dieron su cariño y enseñanzas para nunca rendirme en lograr mis metas.

También agradezco a mi tutor Dr. Luis Galarza por ayudarnos y guiarnos en este trabajo de investigación, quien nos dio otro punto de vista sobre la apicultura y la importancia que tienen las abejas en este mundo.

Agradezco a la Universidad de Cuenca, a los diferentes catedráticos que me han guiado en la carrera para enseñarme a dar lo mejor de mí mismo como estudiante y profesional.

Emanuel Sangurima P.

Dedicatoria

Dedico este trabajo de investigación a todos mis compañeros, futuros colegas y médicos veterinarios zootecnistas, para que cada vez puedan expandir sus conocimientos y mejorar las técnicas de estudio propuestas, para que en un futuro tengamos mejores herramientas de diagnóstico y tratamiento para los animales que cursen con diferentes procesos patológicos.

Elisa Gomezcoello C.

Dedicatoria

Dedico este trabajo primero a Dios por darme la sabiduría, la paciencia y perseverancia que ha sido fundamental en mi vida. Además, a mis padres por no dejar que me rinda en ningún momento y a toda mi familia por ser un apoyo incondicional en mi vida.

Finalmente quiero dedicar esta tesis a mis amigos y novia, por siempre brindarme una ayuda en los momentos más difíciles y darme ánimos cada día para que todos mis proyectos prosperen.

Emanuel Sangurima P.

Abreviaturas

CAE: Conducto auditivo externo

DCA: Diseño completamente al azar

EEM: Error estándar de la media

EEP: Extracto etanólico de propóleo

M. pachydermatis: *Malassezia pachydermatis*

m.s.n.m.: Metros sobre el nivel del mar

OE: Otitis externa

OM: Otitis media

S. aureus: *Staphylococcus aureus*

Spp: Especies

1. Introducción

En la actualidad existe un sinnúmero de enfermedades infecciosas que afectan a los animales domésticos, ante esta situación, la introducción de fármacos como antibióticos y antifúngicos en la práctica clínica supuso una de las intervenciones más importantes dentro del funcionamiento de los sistemas de salud para controlar cientos de patologías, considerándose así una de las herramientas más importantes y eficaces para salvaguardar millones de vidas (Alós, 2015).

No obstante, su uso inadecuado ha provocado una creciente amenaza que deteriora esta eficacia, debido a la resistencia antimicrobiana, con lo cual las infecciones son más graves, y si no son tratadas oportunamente aumentan la mortalidad de los pacientes (Galán et al., 2017; Noriega, 2014).

Dentro de las infecciones dermatológicas más recurrentes y frecuentes en clínica de especies menores tenemos la otitis canina, misma que tiene una prevalencia del 20% a nivel mundial (Bajwa, 2019). Los principales microorganismos causantes de esta afección son: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus pseudintermedius*, *Pseudomonas spp.*, *Escherichia coli*, *Proteus spp.*, y levaduras como: *Malassezia spp.*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger*. Estos microorganismos patógenos suelen proliferarse sobre todo en condiciones de humedad, y ante la presencia de abundante cerumen acumulado en el oído (Stephan et al., 2019).

La otitis es una patología de etiología multifactorial que afecta a los caninos y se encuentra asociada mayormente a infecciones causadas por bacterias y hongos, y se caracteriza por la inflamación del conducto auditivo externo, comezón, secreciones marrones-oscuras malolientes, movimiento constante de la cabeza, entre otros signos (Calle, 2011). Actualmente existe un alto porcentaje de cronicidad y recidiva en casos de otitis canina, que se han visto principalmente relacionados a la resistencia antimicrobiana por el uso indiscriminado de estos fármacos (Gheller et al., 2017).

La resistencia a los antimicrobianos es un fenómeno mundial emergente ya que constituye uno de los principales problemas de salud más graves que existe en la actualidad. Hoy en día podemos ver innumerables consecuencias como la pronta aparición de mecanismos de resistencia a los antibióticos y antifúngicos en los microorganismos, por lo cual se requieren acciones que los reduzcan, ya que con el transcurso del tiempo su impacto será mayor e imparable (Pérez, 2017).

Ante esta situación se ha estudiado desde tiempos ancestrales al propóleo, en el siglo XVII el propóleo formó parte de los libros de medicamentos oficiales para la salud, fue escrito en el primer libro médico de farmacopeas en el papiro de Ebers, ya que se ha demostrado su acción antiinflamatoria, antiséptica, antitumoral, antihipertensiva, inmunoestimulante, así como su excelente poder antimicrobiano. Por ello, ha sido utilizado por médicos, odontólogos, dermatólogos, y médicos veterinarios, ya que siempre han observado resultados positivos tras su uso (Carpio, 2015).

El propóleo es una sustancia compleja que preparan las abejas a partir de resinas (Toreti et al., 2013). Este posee un gran efecto antibacteriano y antifúngico, y los principales componentes responsables de esta propiedad son los flavonoides, seguidos de la galangina, pinocembrina y derivados de los ácidos benzoicos, ferúlicos y cafeicos (Barros, 2007). Múltiples investigaciones han demostrado la buena tolerancia e inocuidad de este producto no observándose efectos adversos tras su uso, por lo cual se considera al propóleo como un compuesto seguro por su origen natural (Morales et al., 2020).

Su composición no es estable ya que varía de acuerdo a la zona geográfica en la que se encuentre, y de la cual sea extraída esta materia prima, influyendo así en su efecto antibacteriano y antifúngico. Sin embargo, independientemente del lugar de su extracción se ha demostrado en varias investigaciones que siempre presenta una eficaz actividad antimicrobiana contra diversos microorganismos patógenos aunque en diferentes concentraciones (Mayta et al., 2014).

La actividad antimicrobiana del propóleo tiene una relación directa con su lugar de origen, ya que los propóleos provenientes de zonas tropicales con altas temperaturas presentan menor eficacia antimicrobiana, en comparación con aquellos provenientes de zonas frías con bajas temperaturas. También se ha expuesto que a mayor altitud sobre el nivel del mar hay un mejor efecto antimicrobiano, esto se explica por la flora y vegetación que presenta cada región (Calla & Quispe, 2016).

En consecuencia, se ha demostrado que la flora, vegetación y ambiente de cada región de la cual se extraiga la materia prima con la cual las abejas producen esta sustancia es determinante en la calidad del propóleo, y obviamente en su actividad antibacteriana y antifúngica (Vázquez, 2010).

2. Objetivos

2.1.1. Objetivo General

- Determinar la actividad antibacteriana y antifúngica *in vitro* del propóleo proveniente de tres regiones ecuatorianas para conocer su poder antimicrobiano frente a infecciones patógenas.

2.1.2. Objetivos Específicos

- ✓ Comparar la eficacia del extracto etanólico de propóleo proveniente de tres regiones ecuatorianas (Costa, Sierra y Oriente) frente a la gentamicina y ante la presencia de *Staphylococcus aureus*.
- ✓ Comparar la eficacia del extracto etanólico de propóleo proveniente de tres regiones ecuatorianas (Costa, Sierra y Oriente) frente al fluconazol y ante la presencia de *Malassezia spp.*

3. Hipótesis

Los extractos etanólicos de propóleo al 20% originarios de tres regiones ecuatorianas muestran actividad antimicrobiana *in vitro* frente al *Staphylococcus aureus* y la *Malassezia spp.*

4. Revisión de literatura

4.1. Propóleo

El propóleo es una materia resinosa, derivado de los exudados de las plantas, las abejas colectan materia prima con lo cual fabrican este compuesto para sellar las hendiduras y grietas que se generan en una colmena (Toreti et al., 2013).

El propóleo es usado por las abejas para revestir las paredes internas, proteger la entrada de intrusos, prevenir el crecimiento de hongos y bacterias en la colmena. Además, la protege contra condiciones climatológicas adversas, ayuda a desinfectarla de manera eficaz, es usado por las abejas para la construcción de sus nidos y consolidar su estructura (Martinotti & Ranzato, 2015).

4.1.1. Origen e historia del propóleo

El propóleo es una sustancia que ha trascendido durante miles de años en la historia de la civilización, desde aproximadamente el año 300 A.C. hasta la presente fecha. En el Egipto antiguo se empleaba el propóleo para embalsamar los cadáveres, mientras que en Grecia y Roma los médicos elaboraron preparaciones con propóleo para tratar diferentes enfermedades, o lo usaban como una medicina de emergencia durante las guerras (Sung et al., 2017).

4.1.2. Origen Botánico

La obtención del propóleo por parte de las abejas se da por la vegetación, por consiguiente, esta vegetación llega a ser diversa dependiendo de la geografía y el clima presente en la región (Paviani et al., 2012). En las zonas templadas, los álamos son la principal fuente de resina para el propóleo, en las zonas tropicales, la fuente vegetal para la producción de propóleo es derivada de la familia *Anacardiaceae* (Salamanca, 2017).

4.1.2.1. Región Costa del Ecuador

Está ubicada al Oeste de la cordillera de los Andes a una altura de 400 m.s.n.m., su humedad varía y su temperatura va de 20°C a 33°C. Su flora se ha afectado por la urbanización y actividad agrícola, se aprecia vegetación primaria, bosques lluviosos, secos y sabanas tropicales (Bravo et al., 2020).

Los principales recursos vegetales de esta región son: ceibo, palma, guayacán, manglares, helechos. Su variedad depende si es un bosque húmedo tropical, seco o llanura. (Barros, 2007).

El propóleo originario de la Costa ecuatoriana en su composición química tiene flavonoides y fenoles, cuya concentración es 56% menor a los de la región Sierra debido a que su vegetación es diferente (Carrasco & Cepeda, 2020).

4.1.2.2. Región Sierra del Ecuador

Está constituida por la cordillera de los Andes, formada por dos cadenas montañosas: la occidental y oriental (Farfán, 2018). La altitud está entre los 1800 a 3500 m.s.n.m., la vegetación que existe en esta región presenta árboles como: aliso, cedro, nogal, pino y eucalipto, sus troncos pueden encontrarse rodeados de orquídeas, musgos, huicundos y helechos (Manosalvas & Mena, 2013).

El propóleo originario de la Sierra está compuesto principalmente por flavonoides y fenoles con distinta proporción. Esto dependerá de la altitud, como demostró Carrasco & Cepeda (2020), donde el propóleo de la parroquia Tupiguachi de la provincia de Pichincha tiene mayor concentración de flavonoides y fenoles en comparación con la parroquia San Pablo de Lago de la provincia de Imbabura, ya que Tupiguachi se encuentra a mayor altitud y tiene una flora diferente.

4.1.2.3. Región Oriente del Ecuador

Se extiende desde la cordillera de los Andes al Este, la temperatura promedio es de 25°C con una humedad relativa del 90%. Se caracteriza principalmente por poseer un bosque tropical húmedo, con llanuras atravesadas por grandes ríos (Bravo et al., 2020). La flora de esta región tiene principalmente plantas herbáceas, es espesa y tiene una gran variedad de plantas y árboles que llegan a superar los 35 metros de altitud (Barros, 2007).

El propóleo proveniente del Oriente presenta como característica principal, que lo diferencia de otros propóleos, una gran cantidad de ácidos grasos, altos niveles de ácido glucónico y una baja cantidad de ácido gálico (Plaza, 2017).



Figura 1: Propóleo recién cosechado

Fuente: (Barros, 2007).

A continuación, se presenta los principales componentes del propóleo proveniente de las tres regiones ecuatorianas.

Tabla 1. Compuestos identificados en muestras de propóleo ecuatoriano.

Compuesto	Muestra			
	Costa	Sierra	Oriente	
	Arenillas	Alamor	Lago agrio	Puyo
β-amirina	X	X	X	X
Glucosa	X	X	X	X
Ácido oleico		X		X
Ácido linoleico				X
Ácido propanoico	X		X	X
Ácido eicosanoico			X	X
Ácido Gálico, eicosanoico hidroxibutanoico, gulónico				X
Feniletanolamina				X
Tricoseno, pentacoseno, oleato de etilo,		X		
D - xilosa	X			
D - galactosa	X		X	
Ácido hidroxiacético		X		X
Xilitol	X	X	X	X

Fuente: (Plaza, 2017)

4.1.3. Características físicas del propóleo

Las abejas producen el propóleo con sustancias generadas por las plantas como: gomas, materiales lipofílicos de las hojas, resinas, látex, entre otros (Salamanca, 2017). El propóleo cuando se maneja a bajas temperaturas o llega a un punto de congelación tiene una consistencia dura y quebradiza, por lo contrario, cuando se expone a temperaturas elevadas su consistencia es blanda, y entre los 60 -70°C se vuelve líquido. Su color cambia de acuerdo a la región y origen botánico, encontrando tonalidades de verde a marrón y rojiza (Martinotti & Ranzato, 2015).

4.1.4. Composición química del propóleo

La composición química depende de las condiciones fitogeográficas del sitio de colección. La resina utilizada para producir el propóleo no es modificada químicamente por las abejas, como ocurre en el caso del néctar. El perfil químico puede variar principalmente por la volatilidad de algunos químicos durante su recolección por las abejas (Domingues, 2013).

El propóleo es una mezcla compleja resinosa que contiene aproximadamente 50% de resina y bálsamo, 30% de cera, 10% de aceites esenciales y aromáticos, 5% de polen y 5% de otros compuestos (Tabla 2). Hasta el día de hoy se han identificado más de 300 componentes químicos en diferentes investigaciones sobre la composición química y la actividad biológica (Anjum et al., 2019).

Tabla 2. Composición química del propóleo.

Composición	Sustancia
Bálsamo (soluble etanol)	
Resina 40-60%	Ácidos fenólicos, flavonoides, lignanos, alcoholes, ésteres de aldehídos, ácidos alifáticos y ésteres alifáticos, cetonas.
Aceites esenciales 3-5%	Monoterpenos, sesquiterpeno y compuestos aromáticos.
No bálsamo	
Cera 20-35%	Cera de abeja y cera de origen vegetal (monoésteres e hidrocarburos).
Polen 5%	Proteínas, aminoácidos (principalmente arginina y prolina).
Otros compuestos 5%	Minerales, vitaminas, azúcares, lactonas, quinonas, ácido benzoico y esteroides.

Fuente: (Domingues, 2013).

En su composición están presentes diferentes compuestos que se pueden agrupar de la siguiente manera: ácidos aromáticos libres (fenólicos), ésteres de ácidos aromáticos, flavonoides (flavononas, flavonas, flavonoles), terpenoides, y otros (hidrocarburos acíclicos y ésteres, alcoholes, aldehídos, ácidos y ésteres alifáticos, aminoácidos, hidrocarburos, derivados del glicerol, cetonas, esteroides, azúcares y alcoholes de azúcar, misceláneas) (De Groot, 2013).

4.1.5. Extracto etanólico de propóleo

El propóleo no se puede comercializar o administrar como materia prima porque no se aprovechan los compuestos químicos que contiene, es recolectado por las abejas de exudados de plantas, a las cuales añaden secreciones salivares para la elaboración del producto final (Barros, 2007). Para separar el material inerte y conservar la parte fenólica es necesario purificarla mediante procesos físicos como la extracción con disolventes. Para desarrollar la purificación hay técnicas como: dilución, agitación, reflujo o extracción Soxhlet (Salamanca, 2017).

El método más usado es la dilución con solvente que preferentemente es el etanol que resulta en la obtención de extracto etanólico de propóleo (Santos & González, 2017). Las cantidades de etanol superiores al 70% extraen la mayoría de los componentes activos del propóleo, sin embargo, el contenido alcohólico no es deseable por lo que se han probado otras alternativas (Domingues, 2013).

4.1.6. Aplicación del propóleo

El propóleo tiene una amplia gama de aplicaciones, donde se ha utilizado como aditivo alimentario para conservar y dar sabor, también es usado como sellador de madera, y la principal aplicación es en la salud (De Groot, 2013). En el área de salud se ha utilizado como: antibacteriano, antifúngico, antiinflamatorio, antiviral, anestésico, antioxidante, antitumoral, antihipertensivo, hepatoprotector, inmunoestimulante, espasmolítico, antiprotozoario, anticancerígeno, antiséptico, cicatrizante y, además posee una gran actividad citotóxica (Anjum et al., 2019).

4.1.6.1. Actividad antibacteriana

La propiedad antimicrobiana es eficaz gracias a los flavonoides que presenta el propóleo, y a la presencia de pinocembrina, galangina y pinobanksina (Martinotti & Ranzato, 2015). El efecto patogénico de las bacterias es afectado porque el propóleo aumenta la permeabilidad de la membrana celular bacteriana, inhibe la producción de ATP, disminuye la movilidad, afecta el potencial de membrana y perturba la generación de ARN y ADN bacteriano (Zulhendri et al., 2021).

A lo largo de los años, varios investigadores han realizado estudios *in vitro* en donde han demostrado la actividad antimicrobiana que posee el extracto etanólico de propóleo contra bacterias gram-positivas y gram-negativas frente a enfermedades infecciosas (Rodríguez et al., 2020; Galarza, 2013).

4.1.6.2. Efecto del extracto etanólico de propóleo en infecciones bacterianas

El propóleo es un producto natural económico que resulta ser beneficioso para el tratamiento de diversas infecciones bacterianas, así como también para el tratamiento de varios tipos de heridas en animales, ya que reduce el tiempo de cicatrización y tiene grandes estándares de seguridad y eficacia (Abu, 2015).

El propóleo ejerce su actividad antibacteriana al mejorar la inmunidad del organismo o actúa directamente sobre el patógeno. En diversos estudios que se han realizado a lo largo de la década han demostrado que el propóleo presenta un mejor efecto antibacteriano contra bacterias gram-positivas en comparación con gram-negativas, esta menor sensibilidad en bacterias gram negativas se debe a que la bacteria posee una pared celular más compleja con una proporción lipídica mayor (Ortega et al., 2011).

La actividad antibacteriana del propóleo se debe a sus compuestos flavonoides y ésteres como: el ácido benzoico, derivados oxi y metoxibenzóicos, ácido *p-cumarínico*, cafeico, ferúlico, bisabolol y galagina. En propóleos tropicales existe disminución de ciertos compuestos fenólicos, pero esto se ve compensado con la presencia de derivados del ácido *p-cumarínico* (Salamanca, 2017).

La capacidad del flavonoide en reducir la resistencia bacteriana es a través de la unión del propóleo a la pared celular, provocando una perforación donde el contenido citoplasmático se expulsa al exterior lo cual genera lisis de la bacteria. Otro mecanismo antibacteriano es cuando el anillo *B* de los flavonoides llega a inhibir la síntesis de ácido nucleico reduciendo el crecimiento bacteriano (Olegário et al., 2019).

Las bacterias se ven afectadas por el propóleo al tener alteraciones sobre la membrana celular, la disrupción del potencial de membrana y la producción de trifosfato de adenosina (ATP), además de disminuir la movilidad bacteriana. En una investigación del EEP polaco se demostró un efecto antibacteriano al eliminar eficazmente el biofilm del *S. aureus* en comparación con el uso de antibióticos convencionales que no logran eliminar esta estructura de la bacteria (Almuhayawi, 2020).

En los años 90 la Universidad de Oxford tras varios estudios realizados sobre el propóleo demostró, que el ácido cinámico y algunos flavonoides son los encargados de eliminar la energía de la membrana citoplasmática, de tal manera que reducen la motilidad bacteriana, provocando que el sistema inmunológico inhiba a la bacteria, además logran potenciar el efecto de los antibióticos (Calla & Quispe, 2016).

Actualmente existe una nueva tendencia para el tratamiento de infecciones bacterianas, y es el uso de gotas óticas de propóleo ya que en varios estudios realizados se ha demostrado que los pacientes muestran una mejora significativa de los parámetros clínicos ante microorganismos como: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Streptococcus spp.*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus intermedius* y *Klebsiella spp.* También se ha comprobado que la eliminación de *S. aureus* con antibióticos con el paso del tiempo resulta difícil, ante esta situación el uso de EEP ha sido eficaz (Lozina et al., 2010; Santana et al., 2012).

Por lo tanto, el propóleo tiene una composición maravillosa, por lo cual en varios estudios se ha comprobado que tiene un amplio espectro antimicrobiológico y potenciales efectos antiinflamatorios, siendo así una nueva terapia prometedora para muchas infecciones bacterianas como la otitis canina externa, ya que brinda excelentes resultados (Lozina et al., 2010; Narváez, 2021).

4.1.6.3. Actividad antifúngica

En la actividad antifúngica del propóleo se han descubierto 26 componentes que tienen un efecto positivo contra hongos como: pinocembrina, ácido cafeico y ácido p-cumarínico. Se ha comprobado que estos componentes tienen efecto positivo contra *Aspergillus*, *Candida*, entre otros (Zulhendri et al., 2021).

En el mecanismo de acción se denota principalmente la capacidad para inducir apoptosis. Además, modifica la expresión de diferentes genes que están involucrados en: la patogenia, adhesión celular, formación de biopelículas, crecimiento filamentoso y cambios fenotípicos (Anjum et al., 2019). El principal componente fenólico que posee el propóleo y afecta a la estructura de los hongos es la pinocembrina, su acción es aumentar la fuga del contenido citoplasmático, alterando la permeabilidad de la membrana y la estructura de la pared celular (Chen et al., 2020).

4.1.6.4. Efecto del extracto etanólico de propóleo en infecciones fúngicas

El propóleo tiene un excelente potencial antimicrobiano, por lo cual es considerado como un candidato antimicótico prometedor contra varias enfermedades fúngicas como la esporotricosis, otitis canina externa, candidiasis cutánea, así como también contra diversos microorganismos como: *Sporothrix schenckii*, *Malassezia pachydermatis*, *Candida spp.*, *Candida albicans* y *Candida glabrata*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* (Lozina et al., 2010; Waller et al., 2017).

El tratamiento con propóleo ante infecciones causadas por hongos es alentador tanto para levaduriforme así como para hongos filamentosos. El efecto antimicótico del propóleo tiene correlación entre el contenido fenólico, flavonoide y la actividad antioxidante. En un estudio brasileño donde se usaron tres tipos de propóleo se determinó que el propóleo con menor cantidad de flavonoides (formononetina y pinocembrina) presentó un menor efecto fungicida (Deegan et al., 2019).

En microscopía electrónica de infecciones causadas por *Cryptococcus neoformans* tratados con extracto etanólico de propóleo a una concentración de 2.5 mg/mL presentan cambios en la morfología y disminución en el tamaño de la levadura, formando poros e invaginaciones en la superficie de la levadura. De igual manera, en un estudio de microscopía electrónica de transmisión se presentó salida de componentes internos, destrucción de organelos y la contracción del contenido lo que puede representar la reducción del tamaño de la levadura (Aldama et al., 2020).

En tratamientos de propóleo contra levaduras de *Malassezia pachydermatis*, se han encontrado alteraciones en la morfología con forma esférica, aspecto grumoso y pérdida de continuidad en la superficie celular. Además, presenta invaginaciones y destrucción celular. Este cambio es semejante a los antimicóticos comerciales que dañan la pared y membrana celular, produciendo la muerte del hongo (Tovar, 2016).

El EEP al 20% frente a *Candida albicans* de la mucosa oral ha reportado que tiene similar potencia a la nistatina (antimicótico macrólido tetraeno) y ha mostrado mejor efectividad que otros antifúngicos como fluconazol, econazol y clotrimazol ante los cuales el hongo genera resistencia (Suarez et al., 2013).

Se ha determinado que el propóleo es capaz de prevenir la formación de biofilms y eliminar sus biopelículas maduras, conjuntamente con la reducción de la filamentación de *Candida albicans* y *Candida tropicalis* dando como resultado que el propóleo es inhibidor de los factores de virulencia de la Candida, de tal manera, significa una alternativa prometedora para combatir la candidiasis (Merino & Ayala, 2017).

Por lo tanto, el propóleo es una resina de origen natural que presenta un gran poder antifúngico, ya que posee un efecto inhibitorio mayor frente a algunos fármacos comerciales, por lo que su uso en pacientes crónicos con recidivas a resultado exitoso y prometedor, avalándolo como una alternativa natural sin efectos colaterales (Fernandez et al., 2007; Cruz Sánchez et al., 2014).

4.1.7. Efectos adversos

Existen diversas investigaciones realizadas con el propóleo y su manejo terapéutico, pero estos trabajos nunca se han enfocado en estudiar un efecto negativo. La principal razón es porque se considera al propóleo como un compuesto seguro por su origen natural. Los componentes son tolerados, siempre y cuando no se administre en dosis altas (Braakhuis, 2019).

La dosis recomendada en humanos es de hasta 2 g/día por kilo de peso, la dosis máxima es de 7.34 g por kilo de peso, y a esta dosis el propóleo podría producir toxicidad. Los principales efectos están relacionados con pacientes alérgicos que desarrollaron dermatitis, urticaria e hinchazón. Este problema se suscitó cuando el uso del propóleo fue de forma tópica (Balica et al., 2021).

4.2. Otitis

4.2.1. Generalidades

La otitis es la inflamación del oído, la cual puede ser del oído externo y medio. Cuando está presente la inflamación en el oído externo con diversos grados de eritema en el pabellón, meato y canal auditivo externo se denomina otitis externa (OE) que se presenta en un 5 al 20% de pacientes caninos, por lo cual la convierte en una de las afecciones más comunes que se presenta en esta especie animal (Dragonetti & Broglia, 2007). Cuando esta afección atraviesa la membrana timpánica la infección puede llegar al oído medio, afecta el tímpano y otras estructuras del oído se denomina otitis media (OM), la cual tiene un mayor índice de incidencia y es más grave que la otitis externa (Karlapudi, 2017).

4.2.2. Etiología

4.2.2.1. Factores predisponentes

Los factores predisponentes cambian el ambiente interno del oído y, en consecuencia, aumenta la proliferación bacteriana que inicia el proceso infeccioso (Harvey & Paterson, 2014).

Entre los factores predisponentes tenemos: conformación anatómica del oído, presencia de folículos pilosos dentro del oído, pelos dentro del conducto auditivo (como en la raza Cocker Spaniel), agua dentro del oído después del baño o grooming, que puede derivar en infecciones por bacterias u hongos. Otros factores son las condiciones ambientales como la temperatura y humedad (Harvey & Paterson, 2014; Vásquez, 2018).

4.2.2.2. Factores perpetuantes

Son los factores que agravan e impiden la cura total del cuadro ótico. Principalmente la presencia de bacterias como: *Staphylococcus intermedius*, *Proteus spp.* *Pseudomonas spp.*, *Escherichia coli*, y de levaduras como: *Malassezia pachydermatis*, *Candida albicans*, entre otros (Manzuc et al., 2011; Vásquez, 2018). Otros factores perpetuantes son cambios patológicos del canal auditivo, tímpano, tejido glandular y oído medio (Harvey & Paterson, 2014). Los principales microorganismos perpetuantes son:

a) *Staphylococcus spp.*

Las bacterias *Staphylococcus spp.*, son microorganismos que tienen relación con diversas patologías que producen afecciones en la superficie de la mucosa y piel en animales y humanos. En perros se han aislado en diferentes condiciones clínicas como: piodermas, otitis, infecciones de heridas, sepsis, neumonías, nefritis e infecciones postquirúrgicas. Sin embargo, el mayor porcentaje de infecciones están relacionadas con dermatologías (Qekwana et al., 2017).

El *Staphylococcus aureus* es una bacteria anaerobia facultativa, Gram-positiva de un diámetro de 0,5 a 1,5 μm que tiene forma de coco, está organizada en racimos, es catalasa positiva y presenta coagulasa, principalmente causa enfermedades en la piel, huesos y tejidos blandos (Park & Seo, 2022).

La bacteria bajo condiciones normales no produce afecciones, pero en el caso de que un paciente este inmunocomprometido el *S. aureus* conlleva a la enfermedad en el huésped, donde la bacteria produce factores que le permiten evitar ser fagocitados por el sistema inmune y al mismo tiempo produce toxinas que afectan a las células sanguíneas y adyacentes (Cervantes et al., 2014).

b) *Malassezia spp.*

Las levaduras de *Malassezia spp.* son organismos lipofílicos, en la actualidad encontramos 16 especies que hospedan a humanos y animales, pueden llegar a actuar como patógenos oportunistas (Rhim et al., 2020). Esta levadura se localiza en las glándulas sebáceas donde obtiene lípidos que son necesarios para su crecimiento (Böhmová et al., 2018). Producen enfermedades como otitis, dermatitis, foliculitis y psoriasis (Nunes & Vandenabeele, 2021).

La *Malassesia pachydermatis* son pequeñas células cilíndricas de 2,5 a 4 μm de longitud y se caracterizan por formar colonias convexas, es la principal especie de interés clínico con respecto a enfermedades óticas. Ésta levadura se presenta en áreas interdigitales, conducto auditivo, pliegues cutáneos y mucosas (Broglia, 2020).

El sobrecrecimiento de la *M. pachydermatis* se da cuando el huésped presenta un desequilibrio en la inmunidad, en ese momento la levadura produce sustancias que llegan a modificar la capa lipídica de la superficie cutánea, provocando lesiones dérmicas dando como resultado reacciones inflamatorias y de hipersensibilidad (Silva, 2017).

4.2.2.3. Factores primarios

Estos factores llegan a provocar otitis externa en oídos sanos y es común encontrar más de un factor que provoque esta afección en pacientes caninos. Por la gran cantidad de etiologías, es difícil diagnosticar el agente causal. Por lo general demandará tiempo, dinero y esfuerzo (Manzuc et al., 2011). Dentro de estos factores se incluyen: alergias, enfermedades endócrinas, enfermedades autoinmunes, ectoparásitos, trastornos de epitelización, trastornos glandulares, cuerpos extraños, enfermedad inmunomediada, viral y microorganismos (Harvey & Paterson, 2014).

A continuación, se presentan los factores primarios de esta patología.

Tabla 3. Factores primarios de otitis externa

Factores primarios	Enfermedades alérgicas	Alergia alimentaria, dermatitis atópica canina.
	Enfermedades endócrinas	Hiperadrenocortisismo endócrino, tumor de células de Sertoli, hipotiroidismo,
	Enfermedades autoinmunes	Lupus eritematoso, pénfigo foliáceo, pénfigo eritematoso.
	Ectoparásitos	Ácaros, protozoarios, moscas, garrapatas.
	Trastornos de epitelización	Seborrea idiopática, adenitis sebácea, dermatosis sensible al zinc y vitamina A.
	Trastornos glandulares	Hiperplasia apocrina, hiper o hipoplasia sebácea, secreción modificada, alteración del volumen secretorio.
	Cuerpos extraños	Pelos, arena, suciedad.
	Enfermedad inmunomediada	Eritema multiforme, vasculitis, erupción medicamentosa.
	Microorganismos	Fúngicos (<i>Aspergillus spp.</i>)
	Enfermedad viral	Distemper canino.

Fuente: (Broglia & Borrelli, 2020; Harvey & Paterson, 2014).

4.2.3. Patogenia

El conducto auditivo externo (CAE) se llega a inflamar por las diferentes etiologías provocando alteraciones. En casos de cronicidad las glándulas apocrinas sufren hiperplasia lo que conduce a una sobreproducción de cera, produciendo un engrosamiento epidérmico y dérmico (fibrosis) de los pliegues auditivos y del CAE, reduciendo el diámetro del canal que puede llegar a estenosis (Broglia, 2020; Dragonetti & Broglia, 2007).

Existen cambios cualitativos y cuantitativos en bacterias asociadas a la OE, el número de bacterias aumenta y la proporción de especies cambia provocando una infección (Harvey & Paterson, 2014). De igual manera la levadura *Malassezia pachydermatis* al aumentar la proliferación y crecimiento produce una respuesta de hipersensibilidad de tipo I (Nunes & Vandenabeele, 2021).

4.2.4. Signos clínicos

Los signos más habituales son: eritema, descamación, tumefacción, costras, alopecia, pelos quebrados, actitud cefálica esquiva, y dolor a la palpación del cartílago auricular. Se presenta con excesivo cerumen espeso y prurito constante, si progresa puede presentarse un olor fétido. El dolor puede manifestarse con rascado y sacudidas excesivas de la cabeza (Broglia & Borrelli, 2020; Dragonetti & Broglia, 2007; Gonzáles, 2021).

4.2.5. Métodos de diagnóstico

Para el correcto diagnóstico de la otitis externa canina se debe realizar un examen microscópico directo, citología de exudados, cultivo, antibiograma y antifungigrama. Otro examen necesario es la otoscopia para verificar el CAE e integridad de la membrana timpánica (Broglia & Borrelli, 2020).

4.2.5.1. Examen microscópico

El objetivo de este examen es el de realizar una búsqueda directa del cerumen a través del microscopio para encontrar ectoparásitos, y sus formas juveniles por ejemplo los ácaros (Rojas & Muñoz, 2019).

4.2.5.2. Examen citológico

Este método diagnóstico consiste en la toma de una muestra de cerumen donde aplicamos la tinción para dar una coloración de tal manera que logremos encontrar los agentes infecciosos presentes. Con ello, se logra identificar bacterias como: cocos, bacilos, levaduras (Rojas & Muñoz, 2019).

Para diferenciar las bacterias Gram-positivas o Gram-negativas se utiliza la tinción de Gram (Dragonetti & Broglia, 2007).

Para determinar que la *Malassezia spp.*, produce una OE es necesario la citología, que se puede obtener por hisopados, raspado e impresión en cinta, donde se aplicará una tinción que podrá ser Azul de lactofenol o tinción de Diff-Quick. El resultado será positivo cuando utilicemos un lente de microscopio de 100x y visualicemos dos o más levaduras por campo (Broglia, 2020; Manzuc et al., 2011).

4.2.5.3. Medios de cultivos bacterianos y antibiogramas

La mayor parte de bacterias que son responsables de infecciones y desarrollan enfermedades están relacionadas con otras bacterias, que son parte de la microbiota normal de la zona afectada. Se han descrito diferentes medios de cultivo que permiten separar a las bacterias que provocan daño y presentan importancia clínica, de las bacterias que existen en circunstancias normales (Murray, 2013).

Para el reconocimiento de las bacterias es necesario usar pruebas bioquímicas y medios de cultivo que faciliten la identificación, las pruebas se basan en la reacción con enzimas y toxinas que se desarrollan en el microorganismo al momento de formar colonias. Basado en este principio existen diferentes medios de cultivo como: Baird -Parker, agar sal manitol, agar estafilococos N° 110, agar ADNasa, agar sangre, entre otros (Zendejas et al., 2014).

El agar sal manitol, es un medio de cultivo selectivo para el aislamiento de estafilococos. El medio contiene: extracto de caseína y extracto de ternera, manitol, rojo fenol y sales (Murray, 2013). Posee un indicador de pH por medio de una coloración de rojo a amarillo, cuando se desarrolla colonias de *Staphylococcus aureus* el medio se acidifica y forma colonias de color amarillo (Durán et al., 2004).

El antibiograma es una prueba que mide la capacidad del antimicrobiano para inhibir la multiplicación bacteriana, el método de difusión por disco de sensibilidad ha sido utilizado alrededor de 70 años (Araya et al., 2015). Este método consiste en colocar sensidiscos o discos de sensibilidad del fármaco de interés en el medio de cultivo con agar Mueller-Hinton, después de 24 horas se mide e interpreta los resultados obtenidos y con ello se determina la eficacia de un antimicrobiano (Montero et al., 2018).

4.2.5.4. Medios de cultivos fúngicos y antifungigramas

Para la identificación de un hongo es necesario el cultivo. Se utiliza una muestra de la zona afectada dermatológicamente, inoculados en agar e incubado en un entorno húmedo con temperaturas de 32-34°C, en período de una a tres semanas. (Guillén, 2020).

La identificación se basa en la morfología microscópica de la colonia y en sus necesidades nutricionales (Böhmová et al., 2018; Brooks et al., 2010).

El medio de cultivo más representativo es el agar dextrosa de Sabouraud el cual no posee adición de lípidos, es utilizado para diferenciar la dependencia de lípidos. La *Malassezia pachydermatis* se logra identificar con este agar (Boekhout et al., 2010). Otros medios de cultivos que son usados para la identificación de hongos son: agar Dixon, agar Leeming-notman y agar Ushijima (Bond et al., 2020).

El antifungigrama es una herramienta que permite medir la susceptibilidad de los hongos a diferentes fármacos antifúngicos (Guillén, 2020). El método recurrente es con la utilización del disco-difusión, que consiste en la manipulación de un disco de sensibilidad impregnado con medicamento y que es depositado dentro de una placa Petri con agar Mueller-Hinton modificado y previamente inoculado con un hongo (Zurita & Urcia, 2017).

4.2.6. Tratamiento

Para tratar una enfermedad ótica es necesario identificar los factores predisponentes, perpetuantes y primarios. Se requiere encontrar el agente causal, los cambios secundarios, mientras se trata los signos clínicos, para ello es recurrente el uso de diversos tipos de fármacos (Rojas & Muñoz, 2019).

4.2.6.1. Limpieza del oído

La limpieza de los oídos es fundamental para ayudar a reducir el cerumen ótico, detritos, cuerpos extraños, permitiendo que la terapia tópica tenga mayor eficacia. La limpieza ayuda a romper la biopelícula que protege a las colonias bacterianas de la terapia antimicrobiana. Además, la limpieza permite una mejor evaluación del conducto auditivo y membrana timpánica (Bajwa, 2018).

Para el proceso de limpieza del oído afectado, primero es necesario evaluar el caso para ver si es necesario el uso de agentes celulolíticos o soluciones antisépticas porque estas pueden llegar a ser ototóxicas. Para el proceso de limpieza sedamos al paciente y utilizamos el otoscopio, en caso de encontrar detritos pueden ser retirados con pinzas y para la limpieza utilizamos solución salina estéril (Manzuc et al., 2011).

Entre los agentes de limpieza más comúnmente utilizados encontramos: ceruminolíticos, astringentes o secantes que son indicados en procesos óticos donde exista exudado graso maloliente entre los más utilizados tenemos: ácido benzoico, salicílico y resorcinol (Rojas & Muñoz, 2019).

El uso de antisépticos se debe dar con precaución y son necesarios en procesos bacterianos o fúngicos como: el ácido acético, ácido bórico, aceites esenciales. Otro agente de limpieza son las soluciones de irrigación que son lo más recomendable en secreciones abundantes y tapones de cerumen entre estos agentes encontramos al yodo povidona y clorhexidina (Harvey & Paterson, 2014; Rojas & Muñoz, 2019).

4.2.6.2. Tratamiento tópico

Para el tratamiento tópico se combina el uso de fármacos glucocorticoides, antibióticos y antimicóticos. En algunas presentaciones de medicamentos se llegan a observar antiparasitarios lo cual no es necesario y dependerá del factor primario. Para que la terapia sea efectiva se requiere un volumen adecuado del fármaco para cubrir el canal auditivo (Manzuc et al., 2011).

a. Glucocorticoides

Es necesario para reducir la inflamación y el prurito, disminuir la hiperproliferación epitelial y minimizar la fibrosis del conducto auditivo, proporcionando comodidad al paciente (Harvey & Paterson, 2014; Manzuc et al., 2011). El uso del corticoide dependerá del grado de eritema e hiperplasia porque con un corticoide de mayor potencia existirá mayor riesgo a efectos colaterales. En casos leves el uso de prednisolona es la más adecuada y en casos más severos se puede administrar medicamentos como betametasona, dexametasona, o aceponato de hidrocortisona (Harvey & Paterson, 2014).

b. Antibacterianos

Ante una infección es necesario el uso de antibacterianos de uso tópico por la colonización de bacterias. Se utiliza principalmente: polimixina, neomicina, gentamicina, enrofloxacina, amikacina y tobramicina, fármacos que se requieren utilizar cada 12 horas (Manzuc et al., 2011). Los fármacos de amplio espectro como la gentamicina no se recomiendan utilizar como primera alternativa para no desarrollar bacterias resistentes (González, 2021).

c. Antifúngicos

El uso de antimicóticos se recomienda cuando existe la infección por *Malassezia* o *Candida*. Es recomendable limpiar el oído antes de usar el antifúngico (Manzuc et al., 2011). Dentro de los grupos farmacológicos antimicóticos encontramos a los poliénicos donde está la nistatina y natamicina, otro grupo son los azoles, dentro de los cuales están: el clotrimazol, posaconazol, miconazol, ketoconazol, y el último grupo es el tiabendazol (Rojas & Muñoz, 2019).

El grupo de poliéno afecta al hongo cuando este producto se une al esterol de la membrana celular del hongo, modifica la permeabilidad y provoca la muerte fúngica por destrucción osmótica. En cambio, los azoles interrumpen la biosíntesis del ergosterol de la pared celular fúngica por inhibición de la enzima P450 (Harvey & Paterson, 2014).

4.2.6.3. Tratamiento sistémico

Cuando una otitis externa es grave, existe presencia de otitis media, hay evidencia de efectos adversos al tratamiento tópico, lo más recomendable es la aplicación de un tratamiento sistémico donde el uso de antibióticos y corticoides es frecuente (Hernández & Merletti, 2009).

4.2.6.4. Tratamiento quirúrgico

Existen casos de otitis externa que son crónicas que no llegan a tener una reacción positiva ante los tratamientos tópicos y no llegan a curarse, para ello existen diferentes técnicas quirúrgicas como: la extirpación de la pared lateral, ablación total del conducto auditivo externo, o la osteotomía de bulla lateral (Radlinsky & Masan, 2007).

4.2.7. Complicaciones terapéuticas

La otitis canina tiene una causa primaria, varias causas perpetuantes y diferentes factores predisponentes, se debe analizar todos estos factores para poder curar la enfermedad, si solamente atacamos las causas perpetuantes, hacemos un mal diagnóstico, o no identificamos los microorganismos que están atacando al oído será imposible acabar definitivamente con esta patología. Por lo tanto, muchas veces podemos confundirnos y administrar medicamentos erróneos que no mataran a los microorganismos presentes, por lo cual habrá una resistencia antimicrobiana (Borges, 2018).

4.2.7.1. Resistencia antibacteriana

Se presenta cuando las bacterias poseen la capacidad de resistir y evadir el efecto de los antibióticos. Existen diferentes mecanismos como: producción de enzimas de la bacteria que destruyen el fármaco, bacterias que modifican la permeabilidad al fármaco, formación de vías metabólicas que modifican la acción inhibitoria del fármaco, entre otras (De Groot, 2013).

La existencia de microorganismos infecciosos resistentes a antibióticos produce una enfermedad prolongada con un increíble aumento en morbilidad y mortalidad de los pacientes. Entre las principales soluciones se aconseja la prevención con el uso racional y no indiscriminado de los antibióticos, también se aconseja rotar los fármacos usados en las clínicas veterinarias, y cumplir con el uso indicado tal cual lo prescriba el médico veterinario (Bourély et al., 2019).

4.2.7.2. Resistencia antifúngica

La resistencia antifúngica se da cuando una cepa es resistente y su concentración mínima inhibitoria es más elevada que la habitual para esa especie de hongos, en donde un hongo puede llegar a ser resistente a un antifúngico cuando éste sigue produciendo la enfermedad en los pacientes, a pesar de que la concentración del agente antimicótico sea máxima en el lugar de infección. Generalmente esto ocurre cuando los pacientes tienen un compromiso grave de la respuesta inmune, por lo cual su sistema inmunológico no es capaz de eliminar el agente patógeno (Manzuc et al., 2011).

Los factores que contribuyen a la resistencia clínica del antifúngico son: la respuesta inmunológica del huésped, la penetración de los fármacos, la presencia de un foco de infección persistente o protegido, y los factores propios de la célula fúngica como el cambio a cepas más resistentes o, alteraciones en el tipo celular. Por lo tanto, siempre se recomienda realizar un antifungigrama, ya que nos permitirá conocer la actividad *in vitro* de los antifúngicos y con ello pronosticar el resultado terapéutico del tratamiento antifúngico seleccionado para cada paciente (Rojas & Muñoz, 2019).

La problemática en el funcionamiento de los sistemas de salud está en la aparición de hongos patógenos que son resistentes a los agentes antifúngicos. Por ejemplo, los azoles son utilizados en salud humana, animal y como protector en cultivos, en ésta sobreexplotación del uso de los azoles se aceleró la evolución independiente y la resistencia del hongo a muchos entornos (Fisher et al., 2018).

Dentro de los fármacos más utilizados para el tratamiento de infecciones fúngicas tenemos los pertenecientes a la familia de los azoles como: itraconazol, ketoconazol, voriconazol, posaconazol, isavuconazol, miconazol y fluconazol, este grupo de fármacos se encargan de alterar la estructura y función de la pared celular fúngica, impidiendo la unión del ergosterol, estos fármacos pueden ser utilizados para el tratamiento de enfermedades fúngicas persistentes, o crónicas (Guillot & Bond, 2020).

No obstante, en informes realizados recientemente en animales domésticos se han desarrollado incontables fracasos terapéuticos con el uso de azoles principalmente en enfermedades dermatológicas de caninos ocasionadas por microorganismos como la *Malassezia pachidermatis*, esto está asociado a un incremento de tolerancia, demostrando un curso crónico de dermatitis y otitis causado por *Malassezia spp.*, que por lo general requiere de tratamientos frecuentes y prolongados que muchas de las veces no logran ser exitosos. (Guillot & Bond, 2020; Rhimi et al., 2020).

5. Materiales y Métodos

5.1. Materiales

a. Materiales Biológicos

- Propóleo proveniente de la Costa, Sierra y Oriente ecuatoriano
- Muestras microbianas provenientes de perros con otitis

b. Materiales Químicos

- Alcohol etílico al 96%
- Agua destilada
- Sensidiscos en blanco
- Fluconazol
- Gentamicina
- Dextrosa al 2%
- Agar Sabouraud
- Agar Manitol
- Agar Mueller – Hinton
- Azul de Lactofenol
- Tinción de Gram

c. Materiales Físicos

- Hisopos estériles
- Guantes de examinación
- Jeringuillas
- Refrigerador
- Congelador
- Papel secante
- Papel aluminio
- Gasas
- Tijeras
- Balanza
- Cronómetro

d. Materiales de Laboratorio

- Microscopio
- Contador de colonias
- Incubadora
- Autoclave
- Cámara de flujo laminar
- Pipetas automáticas
- Cajas Petri
- Espátula de drigalsky
- Asa de siembra
- Mechero de Bunsen
- Regla graduada en milímetros
- Vasos de precipitación
- Cubreobjetos
- Portaobjetos

5.2. Métodos

5.2.1. Área de estudio



Figura 2: Ubicación política – geográfica del lugar

Fuente: Google Maps, (2022).

5.2.2. Ubicación política - geográfica

Los cultivos se realizaron en el Laboratorio de Microbiología y Lactología de la Universidad de Cuenca de la Facultad de Ciencias Agropecuarias y las muestras de pacientes diagnosticados con otitis se obtuvieron en la “Clínica Veterinaria Patas” ubicada en la provincia del Azuay, cantón Cuenca, latitud Sur 2°52´, latitud Oeste 78°59´. Sus condiciones meteorológicas son: altitud 2560 m.s.n.m., pluviosidad anual de 1612 mm, humedad relativa del 65% y temperaturas que oscilan entre 7 y 12°C.

5.2.3. Diseño experimental

Esta investigación fue de tipo experimental, que incluyó un diseño completamente al azar (DCA). De siete pacientes caninos diagnosticados con otitis se obtuvieron las muestras microbianas (bacterias y hongos), y en consecuencia, dos experimentos fueron realizados para evaluar el efecto del extracto etanólico de propóleo (EEP) de cada región ecuatoriana (Costa, Sierra y Oriente) sobre la actividad bacteriana (Experimento 1) y fúngica (Experimento 2), respectivamente.

Ambos experimentos tuvieron 5 tratamientos y 7 repeticiones analizando un total de 98 unidades experimentales. Los experimentos usados se detallan a continuación:

5.2.3.1. Primer experimento: Cultivo bacteriano

- Grupo 1: propóleo de la región Costa
- Grupo 2: propóleo de la región Sierra
- Grupo 3: propóleo de la región Oriente
- Grupo 4: control negativo (alcohol etílico al 96%)
- Grupo 5: control positivo antibiótico (gentamicina)

5.2.3.2. Segundo experimento: Cultivo fúngico

- Grupo 1: propóleo de la región Costa
- Grupo 2: propóleo de la región Sierra
- Grupo 3: propóleo de la región Oriente
- Grupo 4: control negativo (alcohol etílico al 96%)
- Grupo 5: control positivo antifúngico (fluconazol)

5.2.4. Metodología para la investigación experimental

5.2.4.1. Preparación del extracto etanólico de propóleo

Se obtuvo propóleo proveniente de tres regiones ecuatorianas: Costa, Sierra y Oriente, en el laboratorio de Microbiología y Lactología de la Universidad de Cuenca de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, fueron sometidos a purificación de impurezas. Una vez libres de impurezas se procedió a mezclar 200 gramos de propóleo proveniente de cada región ecuatoriana con 800 mililitros de alcohol etílico al 96%. Posteriormente estas mezclas se colocaron en frascos de vidrio color ámbar previamente identificados, durante un mes se procedió a agitar la mezcla cinco veces al día. Transcurrido el mes se filtró cada una de las muestras, y se obtuvo los extractos etanólicos de propóleo de las tres regiones ecuatorianas a una concentración del 20% cada una.

5.2.4.2. Recolección de muestras microbianas

Las muestras microbianas fueron recolectadas en pacientes diagnosticados con otitis canina en la “Clínica Veterinaria Patas” (Cuenca, Ecuador). Las muestras fueron recolectadas con hisopos estériles almacenados en medios de transporte Stuart y transportadas al laboratorio de Microbiología y Lactología de la Universidad de Cuenca.

5.2.4.3. Primer experimento: Efecto del propóleo en bacterias

a. Cultivos de las muestras

En primera instancia, se elaboró el agar sal manitol de acuerdo a la técnica detallada por Gutierrez (2021), diluyendo 33.3 gramos de agar sal manitol en 300 mL de agua destilada en un matraz de Erlenmeyer. Posteriormente, se llevó a ebullición durante un minuto para que se fusionen bien los ingredientes. Una vez diluido el agar fue cubierto con papel aluminio, y esterilizado en autoclave durante 45 minutos, luego se retiró y dejó enfriar durante un momento.

El agar sal manitol preparado junto a las cajas Petri, un mechero de Bunsen y las muestras de los pacientes fueron llevados a la cámara de flujo laminar, se colocó el agar dentro de las cajas Petri y una vez que se solidificó se inoculó las muestras, extendiéndolas por toda la caja Petri, después las cerramos y llevamos a la incubadora donde permanecieron por un período de tres días a 35°C.

Transcurrido ese tiempo se retiraron las cajas Petri de la incubadora y se procedió a observar las colonias obtenidas, mediante la tinción de Gram.

Para preparar la tinción de Gram descrita por, Ducón & Rincón (2010), primero se tiñó con violeta de genciana por un minuto, para fijar el color se usó yodo o lugol por 45 segundos, posterior a ello, se utilizó un decolorante como alcohol-acetona durante 15 segundos, el siguiente paso fue utilizar un colorante de contraste que es la safranina durante 1 minuto, luego de cada uno de estos procedimientos se lavó con agua destilada.

Finalmente, las muestras fueron llevadas al microscopio y se procedió a observar el color final de la tinción, sabiendo que si se teñían de color violeta correspondían a bacterias gram-positivas y, por lo contrario, si se teñían de color rosa pertenecían a bacterias gram-negativas.

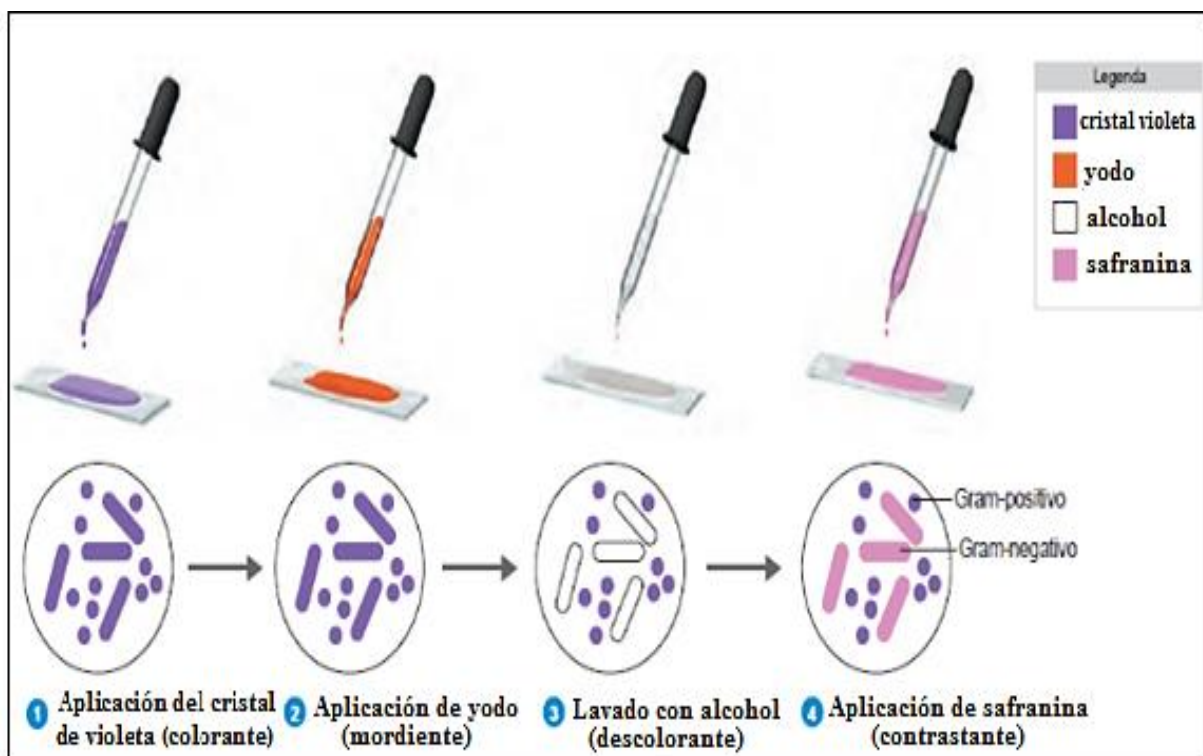


Figura 3: Procedimiento para realizar la tinción de Gram

Fuente: Gelmek (2022).

b. Antibiograma

Se elaboró el agar Mueller - Hinton mediante el método usado por Rossi (2021), para lo cual se diluyeron 76 gramos de agar en 2000 mL de agua destilada, se dejó hervir durante 1 minuto, y luego esta mezcla fue colocada en un matraz de Erlenmeyer cubierto herméticamente con papel aluminio.

Luego fue llevado al autoclave por 45 minutos, pasado este tiempo fue retirado del autoclave y se esperó unos segundos a que se enfríe.

Con la escala de McFarland se midió una porción de los cultivos bacterianos para poder conocer el número existente de microorganismos por mililitro.

Para la obtención de los sensidiscos de extracto etanólico de propóleo al 20% de cada región ecuatoriana, se tomaron sensidiscos en blanco y, luego éstos fueron embebidos con 3 gotas de cada extracto etanólico de propóleo de las tres regiones ecuatorianas (Costa – Sierra – Oriente).

En las cajas Petri, sobre la superficie del agar Mueller – Hinton, se procedió a colocar las colonias bacterianas medidas previamente, luego con un dispensador colocamos los sensidiscos de extracto etanólico de propóleo de las tres regiones ecuatorianas, alcohol etílico al 96% y gentamicina.

Finalmente los antibiogramas fueron llevados a la incubadora en donde permanecieron 24 horas a 35°C.

c. Lectura de los halos de inhibición e interpretación

Para este procedimiento se midieron los halos de inhibición obtenidos de los sensidiscos embebidos con EEP de las tres regiones ecuatorianas, con gentamicina y del grupo control (alcohol etílico al 96%) con una regla graduada en milímetros, basándonos en la técnica de Kirby-Bauer (1984), que indica que se debe medir el diámetro de la zona incluyendo los 6mm del sensidisco, se interpretaron los resultados en base a los diámetros de las zonas de inhibición.

5.2.4.4. Segundo experimento: Efecto del propóleo en hongos

a. Cultivos de las muestras

Se elaboró el agar Sabouraud de acuerdo a la técnica indicada por Britania (2011). En un matraz de Erlenmeyer se diluyó 19.5 gramos de agar en 300 mL de agua destilada, estuvo por 1 minuto en ebullición para su correcta dilución.

Una vez diluido el agar fue cubierto con papel aluminio y fue llevado al autoclave durante 45 minutos, culminado este tiempo se lo retiró y dejó enfriar. El agar junto a las cajas Petri, un mechero de Bunsen y las muestras microbiológicas de los pacientes que presentaron otitis canina fueron llevados a la cámara de flujo laminar.

Posteriormente, se colocó el agar diluido dentro de las cajas Petri, una vez que ya se solidificó la dilución del agar se sembró las muestras extendiéndolas por toda la superficie de las cajas Petri, después se cerraron las cajas, mismas que fueron llevadas a la incubadora en donde permanecieron durante un período de siete días a 32°C.

Transcurrido ese tiempo se retiraron las cajas de la incubadora y se procedió a observar en el microscopio las colonias fúngicas obtenidas, para que puedan ser observadas realizamos una tinción de azul de Lactofenol, la cual nos permitió identificar estos microorganismos.

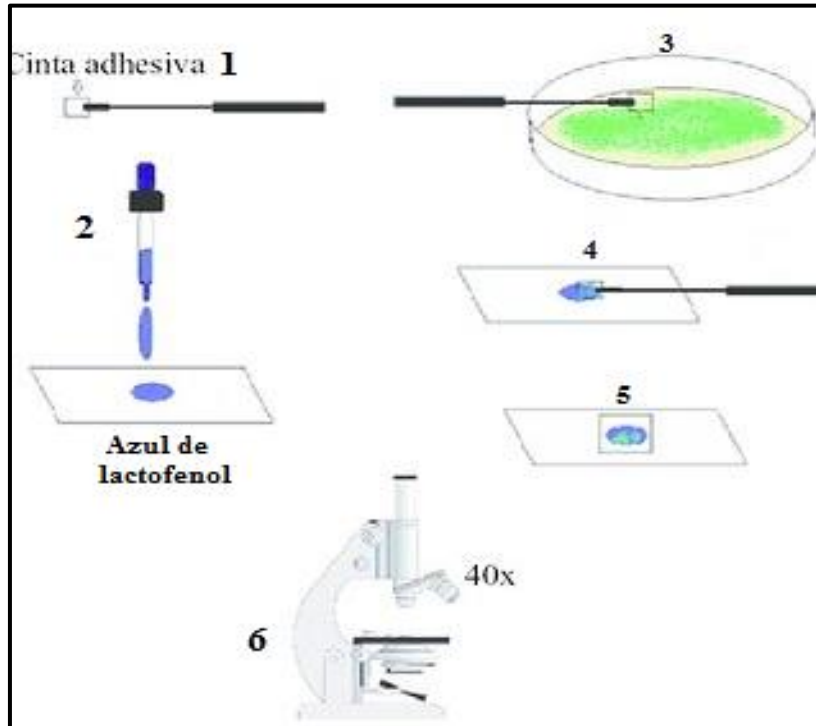


Figura 4: Procedimiento para realizar la tinción con azul de Lactofenol

Fuente: Santos (2015).

b. Antifungigrama

Generados los cultivos fúngicos, fueron medidos con la escala de McFarland y, a continuación colocamos de manera homogénea las colonias fúngicas de *Malassezia spp.*, en toda la caja Petri en el agar de Mueller-Hinton modificado con dextrosa al 2% según la técnica indicada por Rossi (2021).

En un matraz de Erlenmeyer se mezcló 76 gramos de agar en 2000 mL de agua destilada más 40 gramos de dextrosa, se dejó hervir durante 1 minuto, después se cubrió herméticamente el matraz de Erlenmeyer con papel aluminio y luego fue llevado al autoclave donde permaneció por 45 minutos, una vez transcurrido este tiempo lo retiramos y esperamos a que se enfríe.

A la cámara de flujo laminar se llevaron el agar de Mueller - Hinton modificado, las colonias fúngicas obtenidas, un mechero de Bunsen y se procedió a colocar el agar preparado en nuevas cajas Petri, para de esta manera poder realizar el antifungigrama.

Por lo tanto, sobre la superficie del agar Mueller-Hinton modificado con dextrosa al 2% colocamos en cada caja Petri las colonias fúngicas obtenidas previamente, extendiéndolas de forma homogénea por todas las cajas.

Con un dispensador se procedió a colocar los sensidiscos de extracto etanólico de propóleo de las tres regiones ecuatorianas (Costa, Sierra y Oriente) previamente embebidos con 3 gotas de cada extracto etanólico de propóleo al 20%, alcohol etílico al 96% y fluconazol, para lo cual se ejerció una ligera presión para que de esta forma exista un contacto directo. Finalmente fueron llevados a la incubadora en donde permanecieron 24 horas a 32°C.

c. Lectura de los halos de inhibición e interpretación

Para culminar este proceso medimos los halos de inhibición obtenidos de los EEP al 20% de las tres regiones ecuatorianas (Costa, Sierra y Oriente), fluconazol y del grupo control (alcohol etílico al 96%) con una regla graduada en milímetros. Este procedimiento se basó en la técnica descrita por Kirby-Bauer (1984), indicada anteriormente.

5.2.5. Análisis estadístico

Los datos obtenidos de este estudio experimental fueron tabulados en Excel y analizados en el programa estadístico STATISTICA para Windows, versión 12.0 (StatSoft, Tulsa, OK). Se utilizó la prueba de Shapiro-Wilks para determinar la distribución normal de datos, aquellos datos que no siguieron una distribución normal fueron transformados a *Log-10*.

Posteriormente, los datos fueron analizados mediante el ANOVA, y las diferencias entre medias fueron comparadas con la prueba de Tukey con un nivel de significancia de 0.01.

5.2.5.1. Variables del experimento

En esta investigación las variables que se evaluaron fueron las siguientes:

- **Variables independientes:**

- ✓ Tipo de extracto etanólico de propóleo, origen:

- Costa
- Sierra
- Oriente

- **Variables dependientes:**

- ✓ Halo de inhibición (en milímetros)

6. Resultados

6.1. Primer experimento (bacterias): Halos de inhibición

Los halos de inhibición se forman alrededor de cada sensidisco del antibiograma, en donde no hay crecimiento bacteriano, por lo tanto, nos indican su capacidad para inhibirlo y, con ello, identificar el mejor tratamiento para cada paciente.

En esta investigación, la comparación de las medias \pm error estándar de la media (EEM) de los halos de inhibición muestran diferencias altamente significativas ($P < 0,01$) entre tratamientos.

Según indica la Figura 5, los mejores tratamientos fueron con el grupo control positivo (gentamicina) que tuvo un valor promedio de $25,2 \pm 0,46$ mm, casi a la par con el EEP de la región Oriente con un valor promedio de $23,2 \pm 0,43$ mm, seguidos por el EEP de la región Sierra con un valor promedio de $15,4 \pm 0,42$ mm, el EEP de la región Costa presentó el halo de inhibición bacteriano más bajo con un valor promedio de $11,4 \pm 0,24$ mm, mientras que, el grupo control negativo (alcohol) mostró un valor promedio de $7,9 \pm 0,25$ mm, lo cual significa que no presenta halo de inhibición de acuerdo a los parámetros mundiales establecidos por Kirby-Bauer. Esto nos indica que los tratamientos que mostraron una mejor respuesta inhibitoria del crecimiento bacteriano del *S. aureus* fueron el grupo 5 (gentamicina), seguido por el grupo 3 (EEP de la región Oriente).

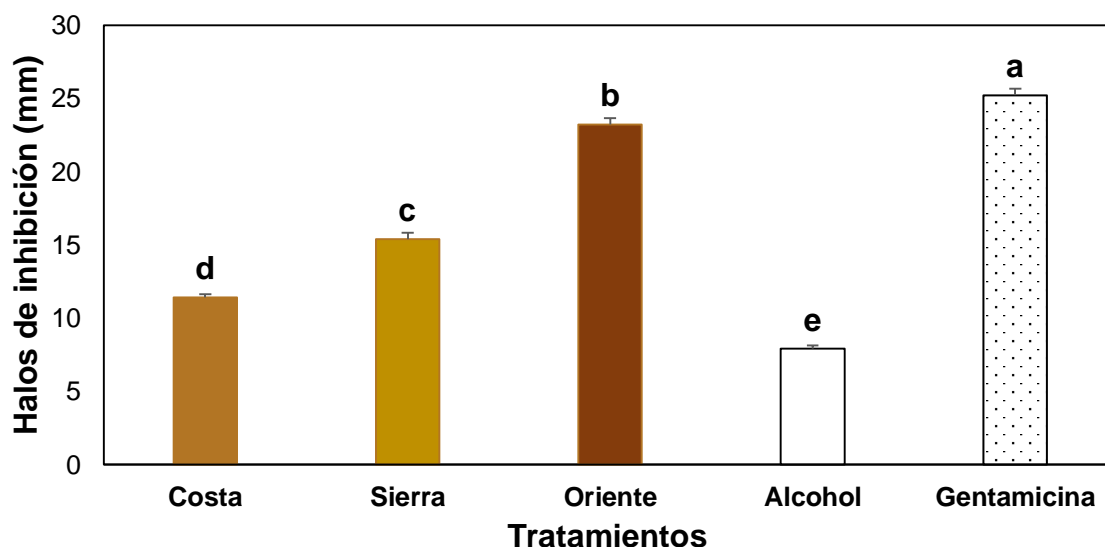


Figura 5: Efecto del EEP de tres regiones ecuatorianas sobre el crecimiento de la bacteria *Staphylococcus aureus*. La figura muestra los halos de inhibición de los distintos tratamientos probados. Letras diferentes en cada barra indican diferencias altamente significativas entre tratamientos (a - b - c - d - e, $p < 0,01$).

6.2. Segundo experimento (Hongos): Halos de inhibición

Los halos de inhibición se establecen alrededor de cada sensidisco del antifungigrama, donde no hay crecimiento fúngico, nos muestran su capacidad para inhibirlo y con ello identificar el mejor tratamiento para cada paciente.

En esta investigación, la comparación de las medias \pm error estándar de la media (EEM) de los halos de inhibición muestran diferencias altamente significativas ($P < 0,01$) entre tratamientos.

Según se indica en la Figura 6, los mejores grupos fueron el EEP de la región Sierra con un valor promedio de $26,1 \pm 0,45$ mm, casi a la par con el EEP de la región Oriente con un valor promedio de $21,9 \pm 0,33$ mm, seguidos por el EEP de la región Costa con un valor promedio de $13 \pm 0,29$ mm. El grupo control positivo (fluconazol) presentó el halo de inhibición más bajo con un valor promedio de $10,7 \pm 0,57$ mm, seguido por el grupo control negativo (alcohol) con un valor promedio de $7,7 \pm 0,23$ mm, lo cual demuestra que no posee halos de inhibición de acuerdo a los parámetros mundiales establecidos por Kirby – Bauer.

Estos hallazgos nos revelan que los tratamientos que mostraron una mejor respuesta inhibitoria ante el crecimiento fúngico de *Malassezia spp.*, fueron el grupo 2 (EEP de la región Sierra), seguido por el grupo 3 (EEP de la región Oriente). Por lo tanto, esto nos permite corroborar el excelente efecto antifúngico que posee el propóleo.

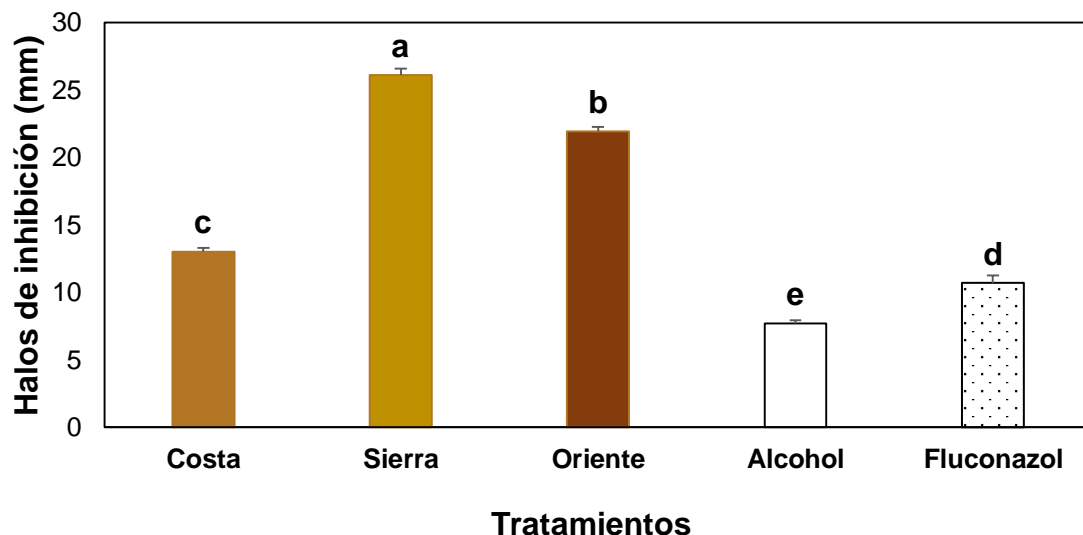


Figura 6: Efecto del EEP de tres regiones ecuatorianas sobre el crecimiento del hongo *Malassezia spp.* La figura muestra los halos de inhibición de los distintos tratamientos probados. Letras diferentes en cada barra indican diferencias altamente significativas entre tratamientos ($a - b - c - d - e$, $p < 0,01$).

7. Discusión

Esta investigación constituye el primer reporte realizado en Ecuador, que informa el efecto bacteriano y fúngico que posee el propóleo proveniente de tres regiones ecuatorianas (Costa, Sierra y Oriente).

La resistencia a los antimicrobianos se considera un problema de salud muy grave, ya que pone en peligro la eficacia de la prevención y tratamiento de muchas enfermedades infecciosas ocasionadas por bacterias y hongos, que se vuelven resistentes a los antimicrobianos, provocando que los medicamentos sean ineficaces, y las infecciones persistan en el organismo de los pacientes incrementando el riesgo de mortalidad (Pérez, 2017; Noriega, 2014).

En consecuencia, la resistencia antimicrobiana se ha convertido en una amenaza creciente para la salud pública mundial, y está poniendo en riesgo los logros de los objetivos de desarrollo sostenible y calidad de vida, por lo cual se requieren medidas para combatir esta problemática (OMS, 2022).

Esta investigación proporcionó información valiosa sobre una opción viable para mitigar esta creciente problemática de resistencia antibacteriana y antifúngica, al demostrar que el propóleo originario de la región Sierra y región Oriente tuvieron un excelente poder antibacteriano y antifúngico para inhibir los microorganismos *Staphylococcus aureus* y *Malassezia spp.*

La composición del propóleo no es estable, ya que varía de acuerdo a la zona geográfica de su extracción, lo cual influye en su efecto antimicrobiano (Noriega, 2014; Mayta et al., 2014). Vázquez (2010), demostró que la vegetación, ambiente y flora de cada lugar de origen del propóleo es determinante en su actividad antimicrobiana, y en su calidad.

Los principales componentes del propóleo son los fenoles y los flavonoides, ya que son los responsables de la actividad bactericida y fungicida que posee. Carrasco & Cepeda (2020), realizaron un estudio bromatológico del propóleo ecuatoriano y demostraron que el propóleo de la región Sierra tuvo mayor cantidad de fenoles y flavonoides en comparación con la región Costa, lo cual se relaciona directamente con la actividad antimicrobiana, es decir, mientras más fenoles existan en el propóleo mejor será su poder antimicrobiano. Esta aseveración coincide con los hallazgos de nuestro estudio, donde se demostró en el experimento 1, que hubo mayor actividad antimicrobiana en el propóleo de la Sierra que de la Costa, el cual tuvo un efecto inhibitorio menor.

Composici et al. (2017), realizaron un análisis por cromatografía de gas y espectrometría del propóleo ecuatoriano proveniente de tres regiones (Costa, Sierra y Oriente), y descubrieron que únicamente el propóleo proveniente de la región Oriente tenía ácido gálico, el cual es un compuesto fenólico que posee gran actividad antioxidante y bactericida, lupeol que tiene un gran efecto antiinflamatorio y antibacteriano, y ácido tetradecanoico que se caracteriza por tener un excelente poder bactericida y fungicida. Esta investigación concuerda los resultados de nuestra investigación, en los cuales la mejor actividad antibacteriana la presentó la región del Oriente.

Calla y Quispe (2016), realizaron un estudio *in vitro* del propóleo proveniente de tres regiones peruanas (Tacna, Arequipa y Cusco), y comprobaron que el propóleo obtenido a mayor altitud sobre el nivel del mar tenía un mejor efecto fungicida debido a que contenía mayor cantidad de fenoles que los de menor altitud (Carrasco & Cepeda 2020). El extracto etanólico de propóleo de la región del Cusco (3399 m s.n.m.) presentó la mejor actividad fungicida, seguido por el extracto etanólico de propóleo de la región de Arequipa (2335 m s.n.m.) y, de la región de Tacna (552 m s.n.m). Esto es consistente con nuestros hallazgos, que demostraron que el extracto etanólico de propóleo de la región Sierra (4500 m s.n.m) presentó el mejor efecto fungicida contra *Malassezia spp.*, seguido por la región Oriente (800 m s.n.m) y la región Costa (26 m s.n.m).

Por otro lado, el halo de inhibición de un antibiograma o antifungigrama es la zona alrededor del disco antibiótico o antifúngico en el cual no hay crecimiento bacteriano o fúngico, es decir es la zona alrededor del disco en la cual no se produce crecimiento en la placa de agar inoculada con el germen, e indica una medida de la potencia del antibiótico o antifúngico frente al microorganismo presente (Sánchez et al., 2016).

Cuando se mide la zona de inhibición de cada sensidisco, se determina el diámetro de la zona incluyendo los 6 mm del sensidisco. Una lectura de 6 mm indica que no hay zona de inhibición ya que corresponde al espacio que ocupa el propio sensidisco. Esto fue corroborado en nuestro estudio en donde los halos de inhibición del grupo control (alcohol etílico) que fueron de 6 mm indicaron que no hubo inhibición del microorganismo estudiado (*Staphylococcus aureus* y *Malassezia spp.*) (Kirby-Bauer 1984). Acevedo (2017) y Cadena et al. (2017), indicaron que halos de inhibición ≤ 8 mm del alcohol etílico no tienen poder de inhibición contra los microorganismos, por lo tanto, esta sustancia no tiene efecto antimicrobiano, lo cual soporta los hallazgos de este estudio, en el que se comprobó que no ejerció actividad antibacteriana ni antifúngica.

En una investigación realizada sobre el efecto antimicrobiano del propóleo por Tabera (2000), y de acuerdo a la técnica cubana establecida para la medición de la actividad antimicrobiana del propóleo indican que halos de inhibición > 12 mm de diámetro significan que el propóleo si tiene efecto antimicrobiano, pero si el halo de inhibición es < 12 mm entonces no existe poder antimicrobiano (Asis, 2005; Chaillou et al., 2004).

Dentro de los patrones estándar del halo de inhibición con el uso de antibióticos como la gentamicina para cepas de *Staphylococcus aureus*, tenemos que aquellas zonas de inhibición con diámetros ≤ 12 son resistentes al antibiótico, mientras que aquellos que presentan zonas de inhibición con diámetros ≥ 15 son sensibles al antibiótico (Carbone, 2002; Picaso, 2000). De acuerdo a esto, en el experimento 1 solo los propóleos originarios de la Sierra y Oriente fueron sensibles al *S. aureus*, mientras que el de la Costa fue resistente dado que su halo de inhibición tuvo $11,4 \pm 0,24$ mm.

Por otro lado, para los patrones estándar del halo de inhibición con el fluconazol para cepas de *Malassezia spp.*, se considera que las zonas de inhibición con diámetros < 14 son resistentes al antifúngico, mientras que aquellos que presentan zonas de inhibición con diámetros > 19 son sensibles al antifúngico (Tapia, 2009; Zurita & Urcia, 2017). Si se aplica esta información a los resultados del experimento 2 de esta investigación, se aprecia que el extracto etanólico preparado con propóleo al 20% originario de la Sierra y Oriente fueron sensibles a la *Malassezia spp.*, mientras que el originario de la Costa tuvo un halo de inhibición menor $13 \pm 0,29$ mm.

Como se demostró en este y otros estudios (Composici et al., 2017; Calla & Quispe, 2016; Carrasco & Cepeda 2020), la actividad antimicrobiana del propóleo está asociada con su lugar de origen, ya que la vegetación que presenta cada región y las condiciones fitogeográficas del sitio de su colección son diferentes y determinan que tengan diferentes constituyentes y proporciones de los mismos. También es importante destacar que en estos últimos años la utilización del propóleo ha incrementado debido a que se han visto sus efectos favorables en la medicina naturista y medicina veterinaria, y constituye un producto natural valioso para la industria cosmética, alimenticia, farmacéutica y médica (Calla & Quispe, 2016; Chaillou et al., 2004; Domingues, 2013).

8. Conclusiones

Esta investigación demostró la actividad antibacteriana y antifúngica *in vitro* del propóleo producido en las tres regiones del Ecuador. El extracto etanólico de propóleo al 20% de la región Sierra y región Oriente tuvieron un excelente efecto antimicrobiano contra el *Staphylococcus aureus* y contra la *Malassezia spp.* En este estudio también se demostró que el extracto etanólico de propóleo al 20% de la región Costa tuvo un menor efecto antimicrobiano, frente a ambos microorganismos.

9. Recomendaciones

- Utilizar herramientas diagnósticas que faciliten el tratamiento de los pacientes como antibiogramas y antifungigramas, para evitar el uso inapropiado de antibióticos y antifúngicos que conlleven a la cronicidad y recidiva de la enfermedad.
- Probar el propóleo frente a infecciones patógenas crónicas en las cuales exista resistencia antimicrobiana, ya que al ser una materia prima de origen natural es una opción viable y eficaz para combatir bacterias y hongos.
- Realizar más investigaciones del efecto antimicrobiano del propóleo frente a otros microorganismos.
- Analizar la composición química y bromatológica de los propóleos provenientes de cada región, para determinar los componentes presentes en cada uno de sus extractos etanólicos.
- Realizar estudios *in vivo* de la actividad antibacteriana y antifúngica del propóleo para evaluar su efectividad.

Referencias

- Abu Seida, A. M. (2015). Effect of propolis on experimental cutaneous wound healing in dogs. *Veterinary medicine international*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/672643>
- Acevedo, M. (2017). Efecto antibacteriano in vitro del extracto hidroalcohólico del aloe vera (Sábila) sobre el *fusobacterium nucleatum* ATCC 25586 [tesis de posgrado, Universidad Nacional de Trujillo]. Repositorio Institucional UNITRU. <http://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/12581>
- Aldama, J. A., Rodríguez, B., González, S., & Cruz Sánchez, T. A. (2020). Daño estructural en *Cryptococcus neoformans* producido por un propóleo mexicano. *Nova Scientia*, 12(25). <https://doi.org/https://doi.org/10.21640/ns.v12i25.2557>
- Almuhayawi, M. (2020). Propolis as a novel antibacterial agent. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(11), 3079–3086. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.09.016>
- Alós, J. I. (2015). Antibiotic resistance: a global crisis. *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica*, 33(10), 692–699. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2014.10.004>
- Anjum, S. I., Ullah, A., Khan, K. A., Attaullah, M., Khan, H., Ali, H., Bashir, M. A., Tahir, M., Ansari, M. J., Ghramh, H. A., Adgaba, N., & Dash, C. K. (2019). Composition and functional properties of propolis (bee glue): A review. *Saudi journal of biological sciences*, 26(7), 1695–1703. <https://doi.org/10.1016/J.SJBS.2018.08.013>
- Araya, I., Prat, S., & Ramírez, V. (2015). Recomendaciones para el control de calidad en bacteriología: estudio de susceptibilidad antimicrobiana. *Departamento laboratorio biomedico nacional y de referencia*, 3-15.
- Asis, M. (2005). Propóleo: el oro púrpura de las abejas. *Centro de Información y Documentación Agropecuaria*. LM Intza <https://dialnet.unirioja.es/servlet/libro?codigo=256324>
- Bajwa, J. (2018). Canine otitis externa: Treatment and complications. *Veterinary Dermatology*, 59(1), 311–313.
- Bajwa, W. (2019). Treatment and complications of otitis. *CanVet*, 60(1).
- Balica, G., Vostinaru, O., Stefanescu, C., Mogosan, C., Iaru, I., Cristina, A., & Pop, C. E. (2021). Potential role of propolis in the prevention and treatment of metabolic diseases. *Journal Plants*, 10(5). <https://doi.org/10.3390/PLANTS10050883>
- Barros, A. (2007). *Flora y fauna regional* (primera ed). FMLGT.
- Boekhout, T., Guého-Kellermann, E., Mayser, P., & Velegriaki, A. (2010). Malassezia and the skin: science and clinical practice. *Malassezia and the skin: science and clinical practice*, 1–319. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-03616-3>
- Böhmová, E., Sihelská, E., & Harčárová, Z. (2018). Diagnostics of malassezia species: a review. *Folia veterinaria*, 62, 19–29. <https://doi.org/10.2478/fv-2018-0013>

- Bond, R., Morris, D. O., Guillot, J., Bensignor, E. J., Robson, D., Mason, K. V., Kano, R., & Hill, P. B. (2020). Biology, diagnosis and treatment of malassezia dermatitis in dogs and cats: clinical consensus guidelines of the world association for veterinary dermatology. *Veterinary dermatology*, 31(1), 75. <https://doi.org/10.1111/VDE.12834>
- Borges, L. (2018). *Otitis canina*. Departamento del Hospital de Urgencias. <https://veterinariasborges.com/>
- Bourély, C., Cazeau, G., Jarrige, N., Leblond, A., Madec, J. Y., Haenni, M., & Gay, E. (2019). Antimicrobial resistance patterns of bacteria isolated from dogs with otitis. *Epidemiology & Infection*, 147. <https://doi.org/10.1017/S0950268818003278>
- Braakhuis, A. (2019). Evidence on the health benefits of supplemental propolis. *Nutrients*, 11(11). <https://doi.org/10.3390/NU11112705>
- Bravo, K., Fernández, A., Parra, H., Tamayo, A., Cevallos, F., Montero, O., Criollo, A., Sánchez, C., & Arauz, E. (2020). *Ecuador: realidad nacional* (2da ed.).
- Britania. (2011). Sabouraud Glucosado Agar. *Laboratorio Britania*, 2.
- Brogliá, G., & Borrelli, S. (2020). Enfermedades del oído. *Compendio de Enfermedades de Los Caninos y Felinos Domésticos*, 396–401. <https://doi.org/10.35537/10915/37329>
- Brooks, G., Carroll, K., Butel, J., Morse, S., & Mietzner, T. (2010). Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg (25th ed.). McGraw Hill.
- Cadena, K., Pazán, P., & Farfán, A. (2017). Efecto antifúngico de diferentes concentraciones del extracto de uncaria tomentosa sobre candida albicans: estudio in vitro. *Revista odontología*, 19(2), 30–39. <https://doi.org/10.29166/ODONTOLOG>
- Calla, K., & Quispe, D. (2016). *Evaluación del efecto antimicrobiano in vitro del propolis "propóleos" de tres regiones del sur del Perú sobre el crecimiento de candida albicans, escherichia coli, staphylococcus aureus y pseudomona aeruginosa* [tesis de pregrado, universidad catolica de santa maria]. Repositorio Institucional UCSM. <https://repositorio.ucsm.edu.pe/handle/20.500.12920/5897>
- Calle, J. (2011). Aislamiento bacteriano en casos de otitis canina y su susceptibilidad antibiótica b. *Revista de Investigación Veterinaria Perú*, 22(2), 161–166.
- Carbone, F. (2002). Manual de procedimientos para la prueba de sensibilidad antimicrobiana por el método de disco difusión. *Instituto Nacional de Salud*, 30, 23–34.
- Carpio, M. D. R. (2015). *Estudio sobre el uso del propóleo como antimicrobiano después de un tratamiento periodontal en pacientes adultos entre 20 y 40 años que acuden a las clínicas de la Facultad Piloto de Odontología de la Universidad de Guayaquil* [tesis de pregrado, Universidad de Guayaquil] Repositorio Institucional. <http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/11376>.

- Carrasco, L., & Cepeda, N. (2020). *Caracterización química y actividad antioxidante de tres muestras de propoleos ecuatorianos* [tesis de pregrado, Universidad Técnica de Machala]. Repositorio Institucional UTM. <http://repositorio.utmachala.edu.ec/handle/48000/16269>
- Cervantes, E., García, R., & Salazar, P. (2014). Características generales de *Staphylococcus aureus*. *Revista Latinoamericana de Patología Clínica*, 61(1), 28–40. <https://doi.org/10.1108/eb020168>
- Chaillou, L., Herrera, H., & Maidana, J. (2004). Estudio del propoleos de santiago de estero, Argentina. *Ciencias Tecnológicas Alimentarias*, 24(1), 11–015. DOI: 10.1590/S0101-20612004000100003
- Chen, C., Chen, J., & Wan, C. (2020). Pinocembrin-7-glucoside (p7g) reduced postharvest blue mold of navel orange by suppressing penicillium italicum growth. *MDPI*, 4(8), 536. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8040536>
- Composici, D. E. L. A., Antileishmanial, A., Muestras, D. E. C., Ecuatorianos, L., & Sin, D. E. A. (2017). *Evaluación de la composición química y actividad antileishmanial de cuatro muestras de propóleos ecuatorianos de abejas sin aguijón* [tesis de pregrado, universidad técnica de machala. Repositorio Institucional UTMATCH. <http://repositorio.utmachala.edu.ec/handle/48000/11432>
- Cruz Sánchez, T. A., García, P. A. E., Zamora, C. I. L., Martínez, M. A., Valencia, V. P., & Orozco, A. L. (2014). Use of propolis for topical treatment of dermatophytosis in dog. *Open Journal of Veterinary Medicine*, 04(10), 239–245. <https://doi.org/10.4236/ojvm.2014.410028>
- De Groot, A. C. (2013). Propolis: A review of properties, applications, chemical composition, contact allergy, and other adverse effects. *Dermatitis*, 24(6), 263–282. <https://doi.org/10.1097/DER.0000000000000011>
- Deegan, K. R., Fonseca, M. S., Oliveira, D. C. P., Santos, L. M., Fernandez, C. C., Hanna, S. A., Machado, B. A. S., Umsza-Guez, M. A., Meyer, R., & Portela, R. W. (2019). Susceptibility of malassezia pachydermatis clinical isolates to allopathic antifungals and brazilian red, green, and brown propolis extracts. *Frontiers in veterinary science*, 6, 460. <https://doi.org/https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00460>
- Domingues, S. (2013). Chemical composition of portuguese propolis bioactive properties. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 396(4), 36–37.
- Dragonetti, A., & Broglia, G. (2007). Otitis externa canina aproximación al diagnóstico. *Veterinaria Cuyana*, 2(1), 28–33. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/119148>

- Ducón, V., & Rincoón, J. (2010). Modelado e implementación de la tinción de Gram. *Pontificia Universidad Javeriana*, 1–72.
- Durán, A., Zhurbenko, R., & Viera, D. (2004). Propuesta de una modificación en la formulación del medio agar manitol salado utilizado en el aislamiento de estafilococos de importancia clínica. *Rev. Cuba. Med. Trop*, 56(3), 172–177.
- Farfán, F. P. (2018). Agroclimatología del Ecuador. *Quito: Editorial Abya-Yala*, 17–40. <https://doi.org/10.7476/9789978104927.0001>
- Fernandez, F. F., Dias, A. L. T., Ramos, C. L., Ikegaki, M., De Siqueira, A. M., & Franco, M. C. (2007). The “in vitro” antifungal activity evaluation of propolis G12 ethanol extract on *Cryptococcus neoformans*. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 49(2), 93–95. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652007000200005>
- Fisher, M. C., Hawkins, N. J., Sanglard, D., & Gurr, S. J. (2018). Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security. *Science*, 742(May), 739–742.
- Galán, J., Fernández, C., & Martínez, G. (2017). Emergencia en cuba de especies de *Aspergillus* resistente a antifúngicos. *BOLIPK*, 27(13), 97–104.
- Galarza, L. (2013). *Determinación del poder antibiótico in vitro del extracto etanólico del propóleo sobre Staphylococcus aureus y Escherichia coli presentes en metritis puerperal bovina* [Tesis de maestría, Universidad de Cuenca]. Repositorio Institucional UC. <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/538>
- Gelmek. (2022). Tinción de Gram. *Health Journal*. 27(2), 1-10.
- Gheller, B. G., Meirelles, A. C. F., Figueira, P. T., & Holsbach, V. (2017). Patógenos bacterianos em cães com otite externa e seus perfis de suscetibilidade a diversos antimicrobianos. *Revista de Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 159–167.
- González, V. L. (2021). Causas de otitis externa con apoyo citológico para un tratamiento efectivo en caninos de la clínica veterinaria “El Paso” [tesis de posgrado, Universidad mayor de San Simon]. Repositorio Institucional UMSS. <http://ddigital.umss.edu.bo:8080/jspui/handle/123456789/27767>
- Google Maps. (2022). *Universidad de Cuenca - Campus Yanuncay, Av. Doce de Octubre, Cuenca*. Mapa oficial. Geoportal. <https://goo.gl/maps/Qp9FMLBgpfyDrMw5>
- Guillen, D. (2020). Caracterización del antifungigrama en urocultivo y cultivo de secreción vaginal realizado en el hospital III Daniel Alcides Carrión [tesis de pregrado, Universidad privada de Tacna]. Repositorio Institucional UPT. <https://repositorio.upt.edu.pe/handle/20.500.12969/1629>

- Guillot, J., & Bond, R. (2020). Malassezia yeasts in veterinary dermatology: an updated overview. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 10, 79. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2020.00079/BIBTEX>
- Gutierrez, J. (2021). Agar Manitol. *Britania*, 1, 1–2. http://www.ucv.ve/fileadmin/user_upload/facultad_farmacia/catedraMicro/proskauer.pdf
- Harvey, R. G., & Paterson, S. (2014). Otitis externa : an essential guide to diagnosis and treatment. (1ed). *CRC Press*
- Hernández, M., & Merletti, V. L. (2009). *Otitis canina externa: aislamiento microbiano y susceptibilidad a los antibióticos* [tesis pregrado, Universidad de la republica]. Repositorio Institucional UDELAR. <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/handle/20.500.12008/19267>
- Karlapudi, S. K. (2017). Diagnosis and management of Malassezia otitis in dogs. *Journal*, 6(9), 36–38.
- Kirby-Bauer. (1984). El Antibiograma de discos. Normalización de la técnica de Kirby-bauer. *Biomédica*, 4(3–4), 112. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v4i3-4.1891>
- Lozina, L. ., Peichoto, M. ., Boehringer, S. ., Koszczuk, P., Granero, G. ., & Acosta, O. . (2010). Efficacy of argentine propolis formulation for topical treatment of canine otitis externa. *Arquivo brasileiro de medicina veterinária e zootecnia*, 62(6), 1359–1366. <https://doi.org/10.1590/s0102-09352010000600010>
- Manosalvas, R., & Mena, P. (2013). Introducción al estudio del ambiente (1ed). *Ministerio del ambiente del Ecuador*. 128-207.
- Manzuc, P., Nolasco, L., & Fogel, F. (2011). Enfermedades del oído externo en perros y gatos. *Veterinary Focus*, 21(3), 118.
- Martinotti, S., & Ranzato, E. (2015). Propolis: A new frontier for wound healing? *Burns and Trauma*, 3(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s41038-015-0010-z>
- Mayta, F., Sacsquispe Contreras, S., Ceccarelli Calle, J., & Alania Mallqui, J. (2014). Propóleo peruano: una nueva alternativa terapéutica antimicrobiana en estomatología. *Revista estomatológica herediana*, 22(1), 50. <https://doi.org/10.20453/reh.v22i1.159>
- Merino, I. R., & Ayala, I. E. (2017). *Eficacia del propóleo del cantón baños en la inhibición de la candida albicans en acrílico para bases de prótesis totales. Estudio in vitro* [tesis de pregrado, Universidad Central del Ecuador]. Repositorio intitucional UCE. <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/9174>
- Montero, M., Vayas, L., Avilés, D., Pazmiño, P., & Erazo, V. (2018). Evaluation of two methods for measuring the sensitivity of growth inhibition of the certified staphylococcus aureus subsp. Aureus strain. *Revista de investigaciones veterinarias del peru*, 29(4), 1543–1547. <https://doi.org/10.15381/rivep.v29i4.15185>








- Morales, W. F., Pylori, H., & Alimento, P. (2020). Evidencia científica del propóleo desde el punto de vista médico. *PROAPI*, 50(1).
- Murray, P. (2013). Introducción a la microbiología médica. In *Microbiología médica*. (9ed), Elsevier.
- Narváez, M. (2021). Determinación de la acción antifúngica del propóleo sobre *Malassezia* spp. en perros domésticos [tesis pregrado, Universidad de Cuenca]. Repositorio Institucional UC. <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/37544>
- Noriega, V. (2014). El propóleo, otro recurso terapéutico en la práctica clínica. *Universidad de Catabria*, 1–28.
- Nunes Rodrigues, T. C., & Vandenabeele, S. I. (2021). Pilot study of dogs with suppurative and non-suppurative malassezia otitis: a case series. *Bmc veterinary research*, 17(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/S12917-021-03066-7/FIGURES/3>
- Olegário, L. S., Andrade, J. K. S., Andrade, G. R. S., Denadai, M., Cavalcanti, R. L., da Silva, M. A. A. P., & Narain, N. (2019). Chemical characterization of four brazilian brown propolis: an insight in tracking of its geographical location of production and quality control. *Food research international*, 123, 481–502. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2019.04.004>
- OMS. (2022). *Resistencia a los antimicrobianos*. Oficina regional para las Americas de la organización mundial de la salud. <https://www.paho.org/es/temas/resistencia-antimicrobianos>
- Ortega, N., Campo, N., & Fajardo, F. (2011). Actividad antibacterial y composición cualitativa de propoleos provenientes de dos zonas climaticas del departamento de cauca. *Bioteología en el sector agropecuario y agroindustrial*, 9(1), 8–16. <https://revistas.unicauca.edu.co/index.php/bioteologia/article/view/766>
- Park, J. Y., & Seo, K. S. (2022). *Staphylococcus aureus*. *Food microbiology: fundamentals and frontiers*, 555–584. <https://doi.org/10.1128/9781555819972.ch21>
- Paviani, L. C., Saito, E., Dariva, C., Marcucci, M. C., Sánchez-Camargo, A. P., & Cabral, F. A. (2012). Supercritical co 2 extraction of raw propolis and its dry ethanolic extract. *Brazilian journal of chemical engineering*, 29(2), 243–251. <https://doi.org/10.1590/S0104-66322012000200005>
- Pérez, D. Q. (2017). Antimicrobial resistance: Evolution and current perspectives in the context of the “one health.” *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 69(3), 1–17.
- Picaso, J. (2000). Procedimientos en microbiología clínica. *Recomendaciones de la sociedad española de enfermedades infecciosas*, 30–44.

- Plaza, C. (2017). *Evaluación de la composición química y actividad antileishmanial de cuatro muestras de propoleos ecuatorianos de abejas sin aguijón*. [tesis de pregrado, Universidad Técnica de Machala]. Repositorio Institucional UTM. <http://repositorio.utmachala.edu.ec/handle/48000/11432>
- Qekwana, D. N., Oguttu, J. W., Sithole, F., & Odoi, A. (2017). Burden and predictors of staphylococcus aureus and s. Pseudintermedius infections among dogs presented at an academic veterinary hospital in south africa (2007-2012). *PeerJ*, 2017(4), e3198. <https://doi.org/10.7717/PEERJ.3198/TABLA-6>
- Radlinsky, M., & Masan, D. (2007). Enfermedades del oído. In s. Ettinger & e. Feldman (eds.), *tratado de medicina interna veterinaria. Enfermedades del perro y el gato*. Elsevier.
- Rhimi, W., Theelen, B., Boekhout, T., Otranto, D., & Cafarchia, C. (2020). Malassezia spp. Yeasts of emerging concern in fungemia. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 10, 370. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2020.00370/BIBTEX>
- Rodríguez, B., Canales, M., Guillermo, J., Carrillo, P., & Cruz Sánchez, A. (2020). Composición química, propiedades antioxidantes y actividad antimicrobiana de propóleos mexicanos Chemical composition, antioxidant properties and antimicrobial activity of Mexican propolis. *Acta Universitaria Multidisciplinary Scientific Journal*, 30. <https://doi.org/http://doi.org/10.15174/au.202>
- Rojas, F., & Muñoz, J. (2019). Relación entre diversas variables anamnésticas, clínicas, y evolutivas en 25 casos de otitis externa en animales de compañía en bogotá [trabajo de pregrado, Universidad de ciencias aplicadas y ambientales UDCA Bogota] Repositorio Institucional UDCA. <https://repository.udca.edu.co/handle/11158/2524>
- Rossi, B. A. (2021). Mueller Hinton Agar (MHA). *Britania*, 29213–29213. https://www.britanialab.com/back/public/upload/productos/upl_6070756160103.pdf
- Salamanca, G. (2017). Orígen, naturaleza, propiedades fisicoquímicas y valor terapeutico del propóleo. *Universidad de Tolima August*, 356.
- Sánchez, E., Castillo, S. L., & García, P. (2016). Actividad antimicrobiana. *Investigación En Plantas de Importancia Médica*, May 2017, 77–100. <http://dx.doi.org/10.3926/oms.334>
- Santana, H. F., Barbosa, A. A. T., Ferreira, S. O., & Mantovani, H. C. (2012). Bactericidal activity of ethanolic extracts of propolis against staphylococcus aureus isolated from mastitic cows. *World journal of microbiology and biotechnology*, 28(2), 485–491. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0839-7>
- Santos, C., & González, A. M. (2017). Phenolic composition of propolis. *Bee products - chemical and biological properties*, 99–111. https://doi.org/10.1007/978-3-319-59689-1_5


- Santos, T. (2015). Tinciones de los hongos. *Universidad de Concepción*.
- Silva, F. (2017). *Avances en técnicas de conservación de Malassezia pachydermatis y estudio de su sensibilidad a diferentes drogas* [tesis doctoral, Universidad de Las Palmas de Gran Canaria]. Repositorio Institucional ULPGC. <https://accedacris.ulpgc.es/handle/10553/54022>
- Stephan, F., Saade, D., & Naaser, M. (2019). The importance of video otoscopy in the diagnosis and treatment of chronic otitis in dogs. *Revue Vétérinaire Clinique*, 54(3).
- Suarez, M. ., Rosende, R. O., & Finten de Tarallo, S. B. (2013). Propiedades del Propóleo y su relación con la salud y la práctica odontológica. *Revista de La Facultad de Odontología*, 6(1), 21. <https://doi.org/10.30972/rfo.611684>
- Sung, S. H., Choi, G. H., Lee, N. W., & Shin, B. C. (2017). External use of propolis for oral, skin, and genital diseases: a systematic review and meta-analysis. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/8025752>
- Tabera, L. (2000). Actividad antibacteriana de propoleo argentinos enfrentados a *Staphylococcus aureus*. *Actas Del Congreso Internacional de Propoleos*, 2, 97.
- Tapia, C. (2009). Actualización en pruebas de susceptibilidad antifúngica. *Revista Chilena de Infectología*, 2(26), 144–150. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182009000200005>
- Toreti, V. C., Sato, H. H., Pastore, G. M., & Park, Y. K. (2013). Recent progress of propolis for its biological and chemical compositions and its botanical origin. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/697390>
- Tovar, N. (2016). *Evaluación antimicótico in vitro del propóleo mexicano sobre malassezia pachydermatis* [tesis de maestría, Universidad Nacional Autónoma de México]. Repositorio institucional UNAM. <https://repositorio.unam.mx/contenidos/352842>
- Vásquez, M. (2018). *Prevalencia de otitis canina externa en pacientes atendidos en el hospital veterinario Sophis VeT-Chiclayo en el período Octubre-Diciembre, 2017* [tesis de pregrado, Universidad nacional pedro ruiz gallo]. Repositorio Institucional UNPRG. <https://repositorio.unprg.edu.pe/handle/20.500.12893/2610>
- Vázquez, J. C. (2010). *Caracterización botánica de los propoleos producidos en distinto origen geografico en la region apícola I - Cuenca del Salado, Pcia. de Buenos Aires* [Tesis doctoral, Universidad politecnica de Valencia]. Repositorio Institucional UPV. <https://riunet.upv.es/handle/10251/12264?show=full>
- Waller, S. B., Peter, C. M., Hoffmann, J. F., Picoli, T., Osório, L. da G., Chaves, F., Zani, J. L., de Faria, R. O., de Mello, J. R. B., & Meireles, M. C. A. (2017). Chemical and cytotoxic analyses of brown brazilian propolis (*apis mellifera*) and its in vitro activity against itraconazole-resistant *sporothrix brasiliensis*. *Microbial Pathogenesis*, 105, 117–121. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.02.022>

- Zendejas, G., Avalos, H., & Soto, M. (2014). Microbiología general de *Staphylococcus aureus*: Generalidades de patogenicidad, métodos de identificación. *Revista Biomed*, 25(3), 129–143.
- Zulhendri, F., Chandrasekaran, K., Kowacz, M., Ravalia, M., Kripal, K., Fearnley, J., & Perera, C. O. (2021). Antiviral, antibacterial, antifungal, and antiparasitic properties of propolis: a review. *Foods* 2021, Vol. 10, Page 1360, 10(6), 1360. <https://doi.org/10.3390/FOODS10061360>
- Zurita, S., & Urcia, F. (2017). Manual de procedimientos técnicos para el diagnóstico micológico. *Instituto Nacional de Salud de Peru (1ed)*.

Anexos

Anexo A: Pacientes	
 <p>Ilustración 1: <i>Paciente 1 - Honey</i></p>	 <p>Ilustración 2: <i>Paciente 2 - Lola</i></p>
 <p>Ilustración 3: <i>Paciente 3 - Copo</i></p>	 <p>Ilustración 4: <i>Paciente 4 - Broni</i></p>
 <p>Ilustración 5: <i>Paciente 5 - Tobías</i></p>	
 <p>Ilustración 6: <i>Paciente 6 - Fern</i></p>	 <p>Ilustración 7: <i>Paciente 7 - Darcy</i></p>

Anexo B: Historias Clínicas



UNIVERSIDAD DE CUENCA

HISTORIA CLÍNICA

HISTORIA CLÍNICA # 1	
Fecha: 01/08/2022	Hora: 8 am

DATOS DEL PROPIETARIO			
Nombres:	Marilú Blanca	Apellidos:	Bravo
Cédula/RUC:	0102833803		
Dirección:	Ayapungo 1-25 y Río Upano		
Teléfono fijo:	2	Celular:	0987625208
Correo electrónico:	bravo.ce@hotmail.com		

DATOS DEL PACIENTE			
Nombre:	Honey	Raza:	Bulldog francés
Color del pelaje:	Negro	Edad:	3 años
Peso:	10.5kg	Especie:	Canina
Sexo:	Hembra		

ANAMNESIS			
Dieta:	Croquetas, arroz, huesos de pollo		
Enfermedades previas:	Complicaciones al parto	Esterilizado:	SI <input checked="" type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>
Cirugías previas:	Cesárea, OUH	N.º de Partos:	1
Esquema vacunal:	Todas	Última desparasitación y producto:	2021
Tratamientos recientes:	Clotrimazol	¿Vive con otros animales?	SI <input type="checkbox"/> NO <input checked="" type="checkbox"/>
Su mascota presenta otitis:	SI <input checked="" type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>	¿Hace cuánto tiempo?	1 mes
Comportamiento del animal:	Activa, juguetona	¿Cuál es el oído afectado?	Am. bus
Motivo de consulta:	La paciente presenta prurito y se rasca mucho las orejas la propietaria informa que tiene muy mal olor y se presentan continuos sangrados de las orejas		
¿Cuál ha sido el tratamiento?	Clotrimazol	¿Existe recidiva?	SI <input checked="" type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>

EXAMEN FÍSICO GENERAL			
Condición corporal:	3	Reflejo tusígeno:	Negativo
T (°C):	38.3°C	FC (L/min):	92
FR: (R/min):	22	TLLC (seg):	2.5
TRPC (seg):	1.5	Pulso:	90
Mucosas:	Normales	Porcentaje dehidratación:	0.1

EXÁMENES COMPLEMENTARIOS Y RESULTADOS		
Fecha orden prueba	Examen	Resultados
01 - Agosto - 2022	Cultivo bacteriano	Positivo a: S. aureus
01 - Agosto - 2022	Cultivo fúngico	Positivo a: Malassezia sp

Diagnóstico presuntivo justificado

- Otitis

DIAGNÓSTICO DEFINITIVO

Otitis externa

Plan terapéutico

- Limpieza de los oídos
- Trichhexidin gotero ótico

Pronóstico

- Vital: Bueno
- Funcional: Bueno

Evolución	
Fecha/hora	03/08/2022 → 08H00
Observaciones	Prurito disminuido y menos rascos

OBSERVACIONES

Ya no hay presencia de sangre en el oído

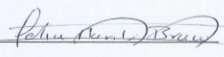


Firma del propietario: 

Ilustración 8: Historia Clínica de Honey



HISTORIA CLÍNICA



HISTORIA CLÍNICA # 2
Fecha: 7-Agosto-2022 **Hora:** 9:36am

DATOS DEL PROPIETARIO
Nombres: Irma **Apellidos:** Pizarro
Cédula/RUC: 0701171374
Dirección: Colombia y Argentina
Teléfono fijo: **Celular:** 0984695059
Correo electrónico: iriella.f@hotmail.com

DATOS DEL PACIENTE
Nombre: Lola **Raza:** Shitzu **Edad:** años 12 **Sexo:** Hembra
Color del pelaje: Crema **Peso:** 9.5kg **Especie:** Canina

ANAMNESIS
Dieta: Comida Casera
Enfermedades previas: Parvovirus, diarrea, puerpera **Esterilizado:** SI NO **N.º de Partos:** NO
Cirugías previas: Esterilización, hernia inguinal
Esquema vacunal: Completo **Última desparasitación y producto:** 3 meses, diantol
Tratamientos recientes: Simpatina **¿Vive con otros animales?:** SI NO **Cuáles:** Gato
Su mascota presenta otitis: SI NO **¿Hace cuánto tiempo?:** 3 días **¿Cuál es el oído afectado?:** Izq **¿Cuál ha sido el tratamiento?:** Simpatina + Oxiclohex **¿Existe recidiva?:** SI NO
Comportamiento del animal: Agresiva, Nerviosa
Motivo de consulta: La paciente presenta muy mal olor de sus oídos y la propietaria informa que tiene constante coacción de sus oídos

EXAMEN FÍSICO GENERAL
Condición corporal: 3 **Reflejo tusígeno:** Negativo
T(PC): 38.0°C **FC (L/min):** 404
FR: (R/min): 28 **TLC (seg):** 25
TRPC (seg): 95 **Pulso:** 97
Mucosas: Normales **Porcentaje deshidratación:** 0%

EXÁMENES COMPLEMENTARIOS Y RESULTADOS

Fecha orden prueba	Examen	Resultados
01-Agosto-2022	Cultivo bacteriano	Positivo a S. aureus
01-Agosto-2022	Cultivo fúngico	Positivo a Malassezia spp

Diagnóstico presuntivo justificado

- Otitis
- Enfermedad preexistente por oídos

Diagnóstico definitivo

Otitis interna

Plan terapéutico

- Limpieza de oídos
- Oxiclohexalico

Pronóstico

- Vital: Bueno
- Funcional: Malo

Evolución

Fecha/hora	Observaciones
13/08/2022 a 09:00	Puntito disminuido y más limpio

OBSERVACIONES

La propietaria informa que Lola tiene mejor apetito.




Firma del propietario: 

Ilustración 9: Historia Clínica de Lola



HISTORIA CLÍNICA



HISTORIA CLÍNICA # 3
Fecha: 08/12/2022 **Hora:** 10am

DATOS DEL PROPIETARIO
Nombres: Andy **Apellidos:** Gonzalezanga
Cédula/RUC: 010443114
Dirección: Ocaña
Teléfono fijo: **Celular:** 0993159392
Correo electrónico: andy.steven.8@gmail.com

DATOS DEL PACIENTE
Nombre: Copo **Raza:** Pastor **Edad:** 7 años **Sexo:** Macho
Color del pelaje: Blanco **Peso:** 9kg **Especie:** Canina

ANAMNESIS
Dieta: Comida Casera
Enfermedades previas: **Esterilizado:** SI NO **N.º de Partos:** 1
Cirugías previas: ORH
Esquema vacunal: Completo **Última desparasitación y producto:** 6 meses Total Full
Tratamientos recientes: Penicilina **¿Vive con otros animales?:** SI NO **Cuáles:** Perros
Su mascota presenta otitis: SI NO **¿Hace cuánto tiempo?:** 07 días **¿Cuál es el oído afectado?:** Izq **¿Cuál ha sido el tratamiento?:** Cevuline, neogard **¿Existe recidiva?:** SI NO
Comportamiento del animal: Tranquilo, Amistoso
Motivo de consulta: El paciente presenta constante coacción de sus oídos y el propietario informa que tiene muy mal olor similar al de chetos.

EXAMEN FÍSICO GENERAL
Condición corporal: 3 **Reflejo tusígeno:** Negativo
T(PC): 38.5°C **FC (L/min):** 88
FR: (R/min): 25 **TLC (seg):** 25
TRPC (seg): 15 **Pulso:** 85
Mucosas: Normales **Porcentaje deshidratación:** 0%

EXÁMENES COMPLEMENTARIOS Y RESULTADOS

Fecha orden prueba	Examen	Resultados
01-Agosto-2022	Cultivo bacteriano	Positivo a S. aureus y S. pseudintermedius
01-Agosto-2022	Cultivo fúngico	Positivo a Malassezia spp.

Diagnóstico presuntivo justificado

- Otitis

Diagnóstico definitivo

Otitis externa

Plan terapéutico

- Limpieza de oídos
- Oxiclohexalico

Pronóstico

- Vital: Bueno
- Funcional: Malo

Evolución

Fecha/hora	Observaciones
13/08/2022 - 10:00	Puntito disminuido

OBSERVACIONES

El propietario informa que ya no tiene tan mal olor de los oídos de Copo.




Firma del propietario: 

Ilustración 10: Historia Clínica de Copo



HISTORIA CLÍNICA



HISTORIA CLÍNICA # 4
Fecha: 03/08/2022 **Hora:** 7 am

DATOS DEL PROPIETARIO
Nombres: Gabriela **Apellidos:** Acuña
Cédula/RUC: 010521066
Dirección: Calle Diana y Jorge Nuño Espino
Teléfono fijo: 4104335 **Celular:** 0983748094
Correo electrónico: g.gaby.cat@hotmail.es

DATOS DEL PACIENTE
Nombre: Broni **Raza:** Pastor Alemán **Edad:** 7 años **Sexo:** Macho
Color del pelaje: Café y Negro **Peso:** 27kg **Especie:** Canino

ANAMNESIS
Dieta: Aprox. harina de trigo, pollo, comida, papaya
Enfermedades previas: Dermatitis, otitis
Cirugías previas: NO
Esquema vacunal: NO, falta de vacuna
Última desparasitación y producto: Hace 3 meses, Bongo
Tratamientos recientes: Oxicel, silitimil, Mirapet
¿Vive con otros animales? NO
¿Cuáles?:
Su mascota presenta otitis: SI X **¿Hace cuánto tiempo?** 5 días **¿Cuál es el oído afectado?** Izq. **¿Cuál ha sido el tratamiento?** Oxicel + silitimil **¿Existe recidiva?** SI X
Comportamiento del animal: Activo, juguetón
Motivo de consulta: Se rasca mucho y llora, tiene mucha secreción de la piel de la barriga negra y muchas lesiones rojizas en las patitas

EXAMEN FÍSICO GENERAL
Condición corporal: 3.5 **Reflejo tusígeno:** Negativo
T (PC): 38°C **FC (l/min):** 92
FR (R/min): 30 **TLC (seg):** 2.5
TRPC (seg): 1.5 **Pulso:** 97
Mucosas: normales **Porcentaje de hidratación:** 0.1

EXÁMENES COMPLEMENTARIOS Y RESULTADOS

Fecha orden prueba	Examen	Resultados
03 - Agosto - 2022	Cultivo bacteriano	Positivo a S. aureus y S. epidermidis
03 - Agosto - 2022	Cultivo fúngico	Positivo a Malassezia spp. Aspergillus niger

Diagnóstico presuntivo justificado
Dermatitis Alérgica

DIAGNÓSTICO DEFINITIVO
Dermatitis Alérgica + Otitis externa

Plan terapéutico
- Prednisolona
- Alexcel
- Otilix C y limpieza de oídos

Pronóstico
- Vital: Bueno
- Funcional: Bueno

Evolución		Observaciones
Fecha/hora	15/08/2022 - 10:00	Puntito disminuido, aumento de apetito

OBSERVACIONES
- La propietaria informa que Broni está más activo y ya no llora por tanto comedón y el puntito de sus ojos está disminuido




Firma del propietario: 

Ilustración 11: Historia Clínica de Broni



HISTORIA CLÍNICA



HISTORIA CLÍNICA # 5
Fecha: 03/10/2022 **Hora:** 08:30

DATOS DEL PROPIETARIO
Nombres: Sandra Padilla **Apellidos:**
Cédula/RUC: 0104820832
Dirección: Calle Kennedy
Teléfono fijo: - **Celular:** 0995620574
Correo electrónico: sandrapadilla1784@gmail.com

DATOS DEL PACIENTE
Nombre: Tobías **Raza:** Poodle **Edad:** 2 años **Sexo:** Macho
Color del pelaje: Blanco **Peso:** 8.5kg **Especie:** Canino

ANAMNESIS
Dieta: Croqueta (comida casera)
Enfermedades previas: Dermatitis
Cirugías previas: -
Esquema vacunal: NO, falta vacia
Última desparasitación y producto: Hace 1 año
Tratamientos recientes: Povidón, silitimil
¿Vive con otros animales? NO
¿Cuáles?:
Su mascota presenta otitis: SI X **¿Hace cuánto tiempo?** 5 días **¿Cuál es el oído afectado?** Izq. **¿Cuál ha sido el tratamiento?** cefixime **¿Existe recidiva?** SI X
Comportamiento del animal: Nervioso, agresivo
Motivo de consulta: El paciente presenta mucho prurito y la piel rojiza, el propietario informa que tiene mal olor en los oídos

EXAMEN FÍSICO GENERAL
Condición corporal: 2.5 **Reflejo tusígeno:** Negativo
T (PC): 38.5°C **FC (l/min):** 102
FR (R/min): 27 **TLC (seg):** 2.5
TRPC (seg): 1.5 **Pulso:** 98
Mucosas: normales **Porcentaje de hidratación:** 0.1

EXÁMENES COMPLEMENTARIOS Y RESULTADOS

Fecha orden prueba	Examen	Resultados
03 - Agosto - 2022	Cultivo bacteriano	Positivo a S. aureus
03 - Agosto - 2022	Cultivo fúngico	Positivo a Malassezia spp

Diagnóstico presuntivo justificado
Dermatitis alérgica

DIAGNÓSTICO DEFINITIVO
Dermatitis alérgica + Otitis externa

Plan terapéutico
- Otilix C y limpieza de oídos
- Alexcel
- prednisolona

Pronóstico
- Vital: Bueno
- Funcional: Bueno

Evolución		Observaciones
Fecha/hora	15/10/2022 - 09:00	Puntito disminuido, piel más rojiza

OBSERVACIONES
El propietario informa que ha disminuido el mal olor de sus oídos




Firma del propietario: 

Ilustración 12: Historia Clínica de Tobías



HISTORIA CLÍNICA



HISTORIA CLÍNICA # 6

Fecha: 03/08/2022 Hora: 09:00am

DATOS DEL PROPIETARIO

Nombres: Sandi Corry Apellidos: _____
 Cédula/RUC: 0152000576
 Dirección: Rectoría, Aurelio Ochoa Alvariz L-136
 Teléfono fijo: _____ Celular: 996761313
 Correo electrónico: eselsea@outlook.com

DATOS DEL PACIENTE

Nombre: Fern Raza: Fox Terrier Edad: 2 years Sexo: Hembra
 Color del pelaje: blanco Peso: 10kg Especie: perro

ANAMNESIS

Dieta: ProPac
 Enfermedades previas: Enfermedad biliar Esterilizado: SI NO N.º de Partos: X
 Cirugías previas: OUH
 Esquema vacunal: Incompleto Última desparasitación y producto: 03/08/2022 Proazpi
 Tratamientos recientes: Ceviline ¿Vive con otros animales? SI NO Cuáles: Perro
 Su mascota presenta otitis: SI ¿Hace cuánto tiempo? 3 días ¿Cuál es el oído afectado? Izq. ¿Cuál ha sido el tratamiento? Ceviline ¿Existe recidiva? SI
 Comportamiento del animal: Amigable y juguetona
 Motivo de consulta: El propietario informa que la paciente presenta mucha comedia

EXAMEN FÍSICO GENERAL

Condición corporal: 3 Reflejo tusígeno: Negativo
 T(°C): 38.4°C FC (L/min): 100
 FR (R/min): 26 TLCC (seg): 28
 TRPC (seg): 15 Pulso: 99
 Mucosas: normales Porcentaje dehidratación: 01

EXÁMENES COMPLEMENTARIOS Y RESULTADOS

Fecha orden prueba	Examen	Resultados
03-Agosto-2022	Cultivos bacterianos	Positivo a S. aureus
03-Agosto-2022	Cultivos fúngicos	Positivo a Malassezia spp

Diagnóstico presuntivo justificado

Otitis externa
 Dermatitis alérgica
 Otitis

DIAGNÓSTICO DEFINITIVO

Otitis externa

Plan terapéutico

- Limpieza de oídos
 - Orogelina gel ática

Pronóstico

- Funcional: Bueno
 - Vital: Bueno

Evolución

Fecha/hora	Observaciones
15/08/2022 a 10:40	Recibo disminuido

OBSERVACIONES

El propietario informa que el paciente está más activo y de mejor apetito




Firma del propietario: 

Ilustración 13: Historia Clínica de Fern



HISTORIA CLÍNICA



HISTORIA CLÍNICA # 7

Fecha: 03/08/2022 Hora: 09:30 am

DATOS DEL PROPIETARIO

Nombres: Sandi Corry Apellidos: _____
 Cédula/RUC: 0152000576
 Dirección: Rectoría, Aurelio Ochoa Alvariz L-136
 Teléfono fijo: _____ Celular: 096761313
 Correo electrónico: eselsea@outlook.com

DATOS DEL PACIENTE

Nombre: Darcy Raza: mixto Edad: 2 years Sexo: Hembra
 Color del pelaje: negro/rojo Peso: 15kg Especie: perro

ANAMNESIS

Dieta: ProPac
 Enfermedades previas: _____ Esterilizado: SI NO N.º de Partos: X
 Cirugías previas: OUH
 Esquema vacunal: Incompleto Última desparasitación y producto: 03/08/2022 Proazpi
 Tratamientos recientes: Ceviline ¿Vive con otros animales? SI NO Cuáles: Perro
 Su mascota presenta otitis: SI ¿Hace cuánto tiempo? 1 día ¿Cuál es el oído afectado? Izq. ¿Cuál ha sido el tratamiento? Ceviline ¿Existe recidiva? NO
 Comportamiento del animal: Nerviosa y juguetona
 Motivo de consulta: El propietario informa que la paciente presenta prurito, a-ejas enrojecidas y sangrado de las mamas.

EXAMEN FÍSICO GENERAL

Condición corporal: 3 Reflejo tusígeno: Negativo
 T(°C): 38.2°C FC (L/min): 105
 FR (R/min): 29 TLCC (seg): 25
 TRPC (seg): 15 Pulso: 98
 Mucosas: normales Porcentaje dehidratación: 01

EXÁMENES COMPLEMENTARIOS Y RESULTADOS

Fecha orden prueba	Examen	Resultados
03-Agosto-2022	Cultivos bacterianos	Positivo a S. aureus y S. pseudintermedius
03-Agosto-2022	Cultivos fúngicos	Positivo a Malassezia spp

Diagnóstico presuntivo justificado

Otitis
 Dermatitis alérgica

DIAGNÓSTICO DEFINITIVO

Otitis externa

Plan terapéutico

- Orogelina gel ática
 - Limpieza de los oídos

Pronóstico

- Funcional: Bueno
 - Vital: Bueno

Evolución

Fecha/hora	Observaciones
15/08/2022 a 10:43	Recibo disminuido y otras mejoras

OBSERVACIONES

El propietario informa que el paciente ya no presenta sangrado de sus mamas.


Firma del propietario: 

Ilustración 14: Historia Clínica de Darcy

Anexo C: Recolección de muestras



Ilustración 15: Muestra de Honey



Ilustración 16: Muestra de Lola



Ilustración 17: Muestra de Copo

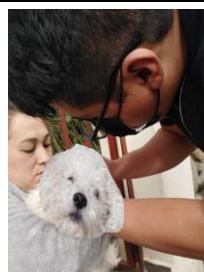


Ilustración 18: Muestra de Tobías



Ilustración 19: Muestra de Broni



Ilustración 20: Muestra de Fern y Darcy

Anexo D: Elaboración de los extractos etanólicos de propóleo



Ilustración 21: Propóleos provenientes de las regiones Costa, Sierra y Oriente



Ilustración 22: Alcohol etílico al 96%



Ilustración 23: Mezcla de propóleo con alcohol etílico al 96%



Ilustración 24: Elaboración del extracto etanólico de propóleo



Ilustración 25: Extractos etanólicos de propóleo de las regiones: Costa, Sierra y Oriente



Ilustración 26: Refrigeración de los extractos etanólicos de propóleo para que puedan ser filtrados



Ilustración 27: Filtración de los extractos etanólicos de propóleo

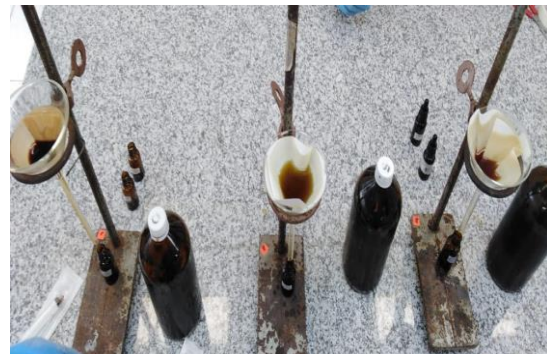









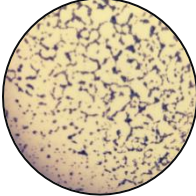
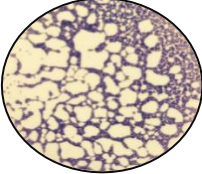
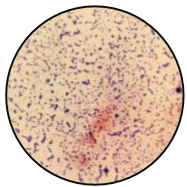
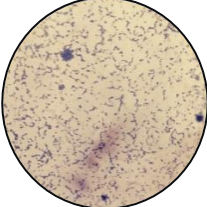
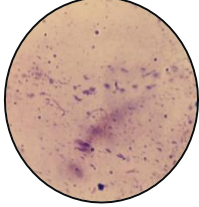
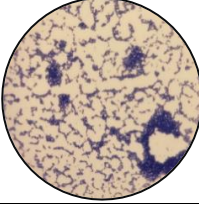
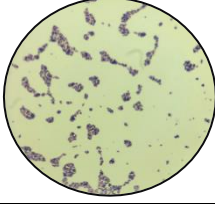



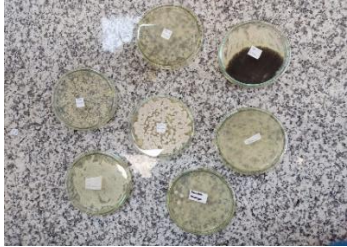

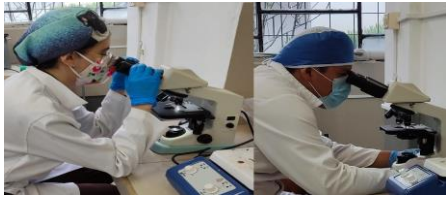
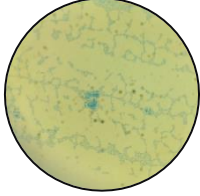
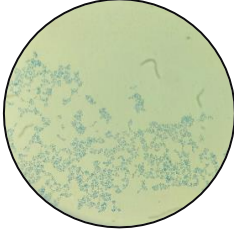
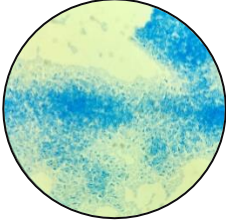
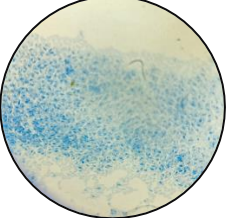
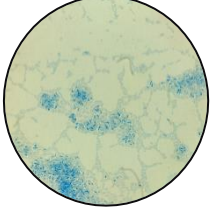
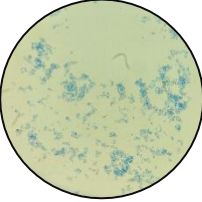
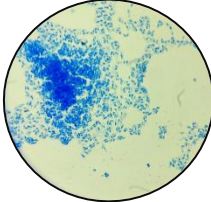




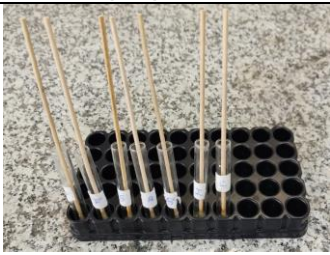
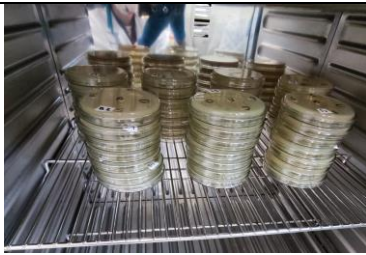


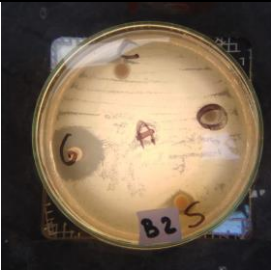
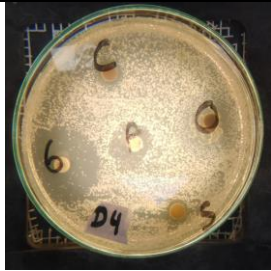
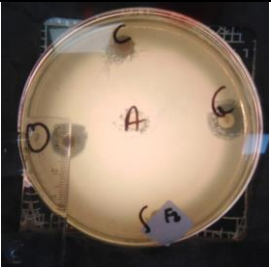
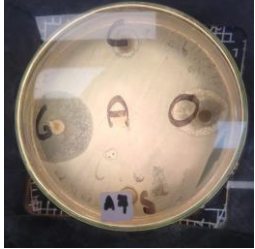

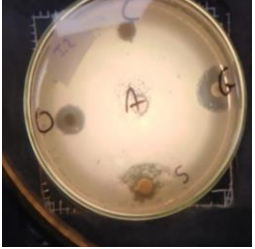
Ilustración 28: Filtración de los extractos etanólicos de propóleo

 <p>Ilustración 29: <i>Extracto etanólico al 20% de la región Costa</i></p>	 <p>Ilustración 30: <i>Extracto etanólico al 20% de la región Sierra</i></p>
 <p>Ilustración 31: <i>Extracto etanólico al 20% de la región Oriente</i></p>	 <p>Ilustración 32: <i>Extracto etanólico de propóleo listo para ser usado</i></p>

<p align="center">Anexo E: Elaboración de los medios de cultivos</p>	
 <p>Ilustración 33: <i>Agares</i></p>	 <p>Ilustración 34: <i>Pesaje de los agares</i></p>
 <p>Ilustración 35: <i>Mezcla de agua destilada con agar</i></p>	 <p>Ilustración 36: <i>Ebullición de agares</i></p>
 <p>Ilustración 37: <i>Agares cubiertos con papel aluminio</i></p>	 <p>Ilustración 38: <i>Agar Manitol, Sabouraud, Mueller-Hinton preparados</i></p>

Anexo F: Cultivos Bacterianos		
 <p>Ilustración 39: Preparación de los cultivos bacterianos en la cámara de flujo laminar</p>	 <p>Ilustración 40: Medios de cultivo con agar Manitol</p>	
 <p>Ilustración 41: Siembra de las muestras en los agares</p>	 <p>Ilustración 42: Medios de cultivo en la incubadora</p>	
 <p>Ilustración 43: Crecimiento bacteriano luego de 3 días</p>	 <p>Ilustración 44: Tinción de Gram</p>	
 <p>Ilustración 45: <i>Staphylococcus aureus</i> en la muestra de Honey</p>	 <p>Ilustración 46: <i>S. aureus</i> en la muestra de Lola</p>	 <p>Ilustración 47: <i>Staphylococcus aureus</i> en la muestra de Copo</p>
 <p>Ilustración 48: <i>Staphylococcus aureus</i> en la muestra de Broni</p>	 <p>Ilustración 49: <i>Staphylococcus aureus</i> en la muestra de Tobías</p>	
 <p>Ilustración 50: <i>Staphylococcus aureus</i> en la muestra de Fern</p>	 <p>Ilustración 51: <i>Staphylococcus aureus</i> en la muestra de Darcy</p>	

Anexo G: Cultivos Fúngicos		
 <p>Ilustración 52: Preparación de los cultivos fúngicos en la cámara de flujo laminar</p>	 <p>Ilustración 53: Medios de cultivo con agar Sabouraud</p>	
 <p>Ilustración 54: Medios de cultivo en la incubadora</p>	 <p>Ilustración 55: Crecimiento fúngico luego de 7 días</p>	
 <p>Ilustración 56: Tinción con azul de lactofenol</p>	 <p>Ilustración 57: Observación de microorganismos en el microscopio</p>	
 <p>Ilustración 58: <i>Malassezia</i> spp. en la muestra de Honey</p>	 <p>Ilustración 59: <i>Malassezia</i> spp. en la muestra de Lola</p>	 <p>Ilustración 60: <i>Malassezia</i> spp. en la muestra de Copo</p>
 <p>Ilustración 61: <i>Malassezia</i> spp. en la muestra de Broni</p>	 <p>Ilustración 62: <i>Malassezia</i> spp. en la muestra de Tobías</p>	
 <p>Ilustración 63: <i>Malassezia</i> spp. en la muestra de Fern</p>	 <p>Ilustración 64: <i>Malassezia</i> spp. en la muestra de Darcy</p>	

Anexo H: Antibiogramas		
 <p>Ilustración 65: Discos en blanco embebidos con extracto etanólico de propóleo</p>	 <p>Ilustración 66: Preparación de los antibiogramas en la cámara de flujo laminar</p>	
 <p>Ilustración 67: Medición con la escala de turbidez de McFarland</p>	 <p>Ilustración 68: Incubación de los antibiogramas</p>	
 <p>Ilustración 69: Lectura de halos de inhibición con el contador de colonias</p>	 <p>Ilustración 70: Antibiograma de Copo</p>	
 <p>Ilustración 71: Antibiograma de Broni</p>	 <p>Ilustración 72: Antibiograma de Darcy</p>	 <p>Ilustración 73: Antibiograma de Fern</p>
 <p>Ilustración 74: Antibiograma de Honey</p>	 <p>Ilustración 75: Antibiograma de Tobías</p>	 <p>Ilustración 76: Antibiograma de Lola</p>

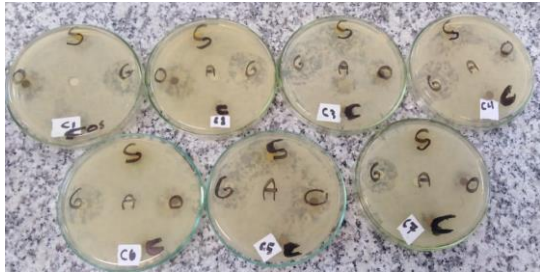


Ilustración 77: Antibiogramas de Honey

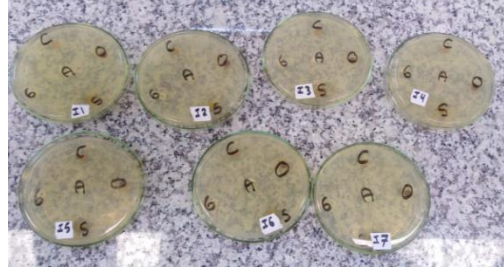


Ilustración 78: Antibiogramas de Lola

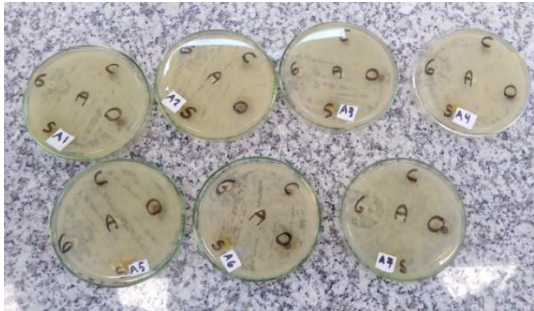


Ilustración 79: Antibiogramas de Copo

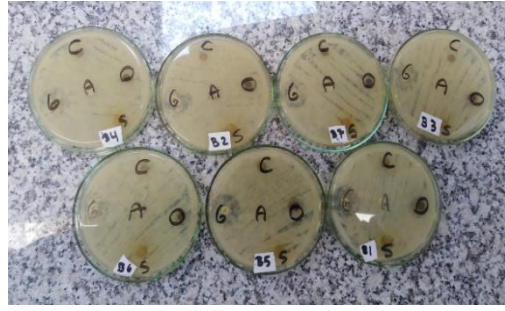


Ilustración 80: Antibiogramas de Broni

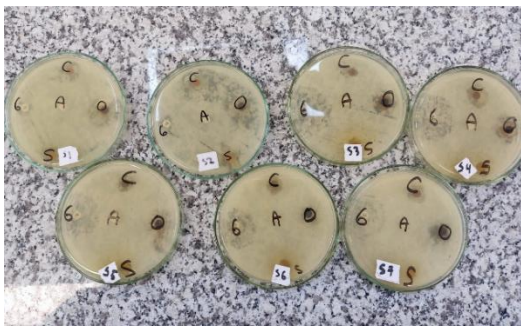


Ilustración 81: Antibiogramas de Tobías

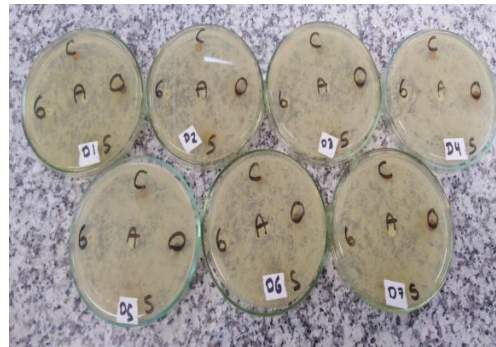


Ilustración 82: Antibiogramas de Darcy

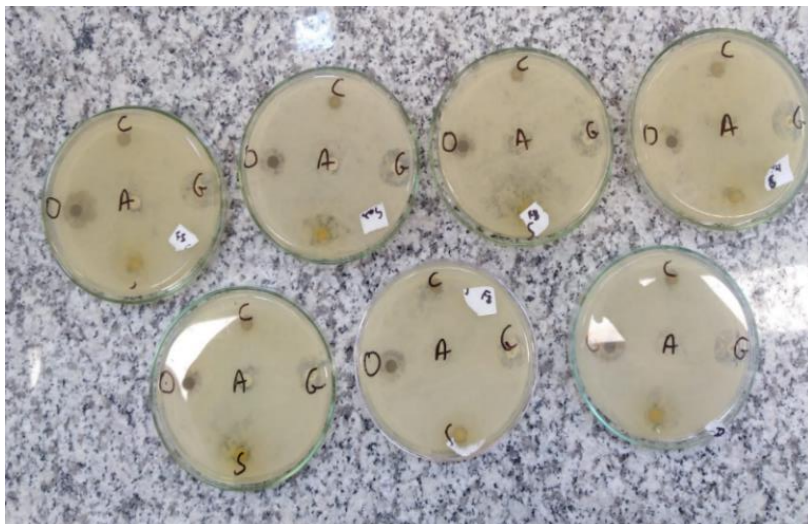


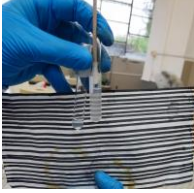


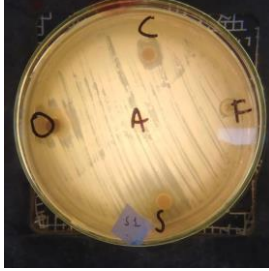

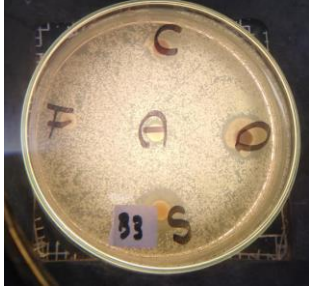
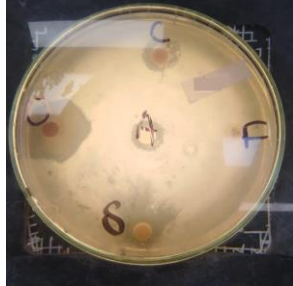

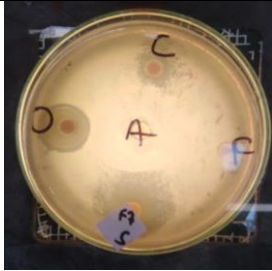
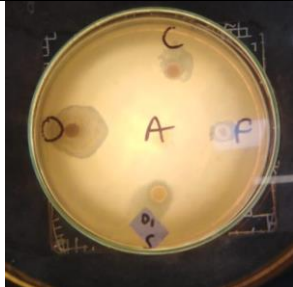


Ilustración 83: Antibiogramas de Fern

Anexo I: Antifungigramas		
 <p>Ilustración 84: Discos en blanco embebidos con EEP</p>	 <p>Ilustración 85: Preparación de los antifungigramas en la cámara de flujo laminar</p>	
 <p>Ilustración 86: Comparación con la escala de turbidez de McFarland</p>	 <p>Ilustración 87: Incubación de los antifungigramas</p>	
 <p>Ilustración 88: Lectura de los halos de inhibición con el contador de colonias</p>	 <p>Ilustración 89: Antifungigrama de Tobías</p>	
 <p>Ilustración 90: Antifungigrama de Honey</p>	 <p>Ilustración 91: Antifungigrama de Broni</p>	 <p>Ilustración 92: Antifungigrama de Lola</p>
 <p>Ilustración 93: Antifungigrama de Copo</p>	 <p>Ilustración 94: Antifungigrama de Fern</p>	 <p>Ilustración 95: Antifungigrama de Darcy</p>

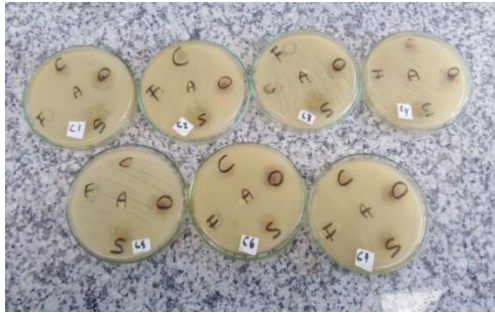


Ilustración 96: Antifungigrama de Honey

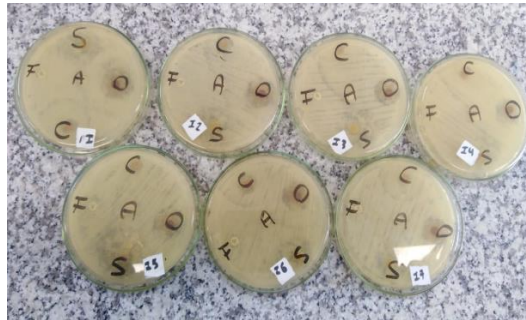


Ilustración 97: Antifungigrama de Lola

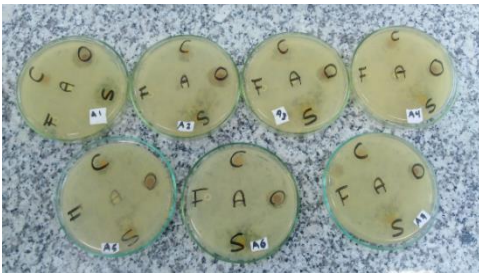


Ilustración 98: Antifungigrama de Copo

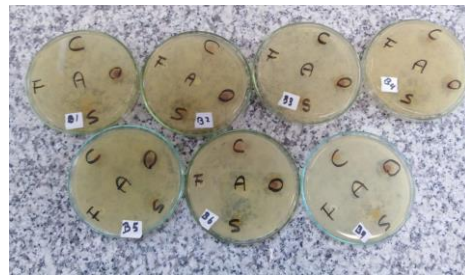


Ilustración 99: Antifungigrama de Broni

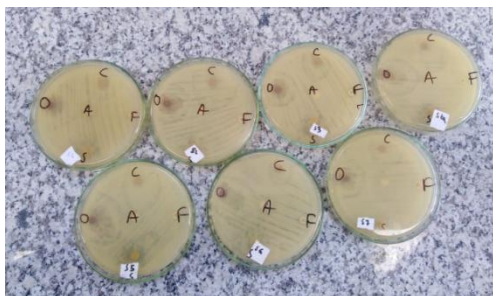


Ilustración 100: Antifungigrama de Tobías

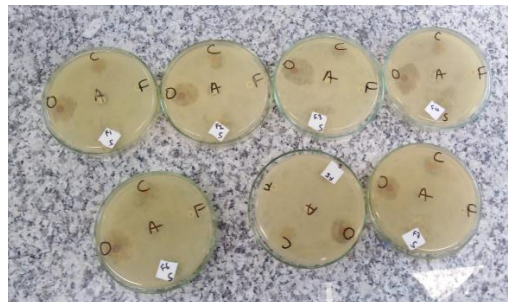


Ilustración 101: Antifungigrama de Fern

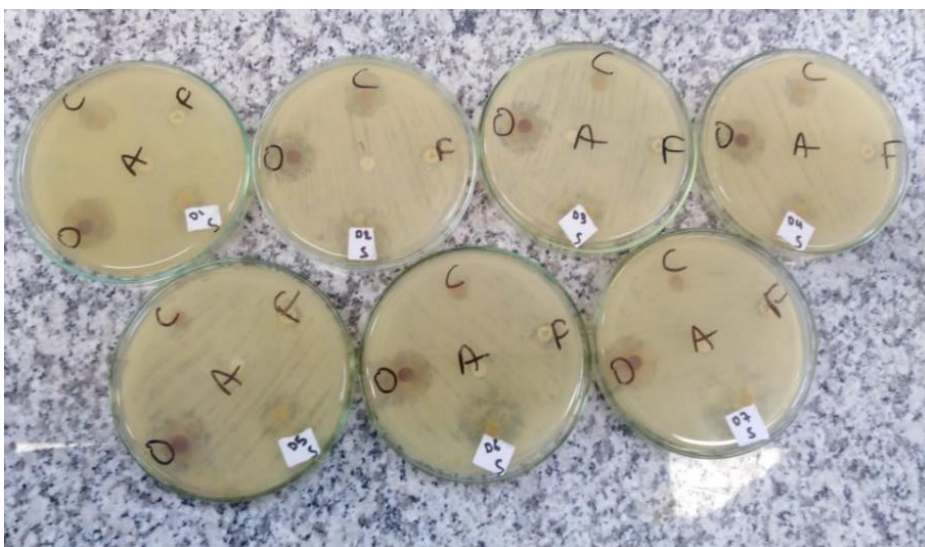


Ilustración 102: Antifungigrama de Darcy