

Obtención, caracterización y evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos de Campeche

The collection, characterisation and evaluation of antimicrobial activity of propolis extracts from Campeche, Mexico

TOLOSA, L*., CAÑIZARES, E*.

Profesores investigadores de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Campeche, México. E-mail: tolosali@hotmail.com. eduar50cu@yahoo.com.

RESUMEN

Entre los productos que se pueden obtener de la colmena se encuentran la cera, la miel, la jalea real y el propóleo. Este último es una mezcla de composición química compleja que contiene bálsamos, aceites etéreos, polen, vitaminas, algunos minerales y proteínas, sustancias que le confieren una variedad de propiedades biológicas de gran interés para fines terapéuticos.

Por esta razón en el presente estudio se obtuvieron y caracterizaron extractos etanólicos y acuosos de propóleos de diferentes localidades del estado de Campeche, México, probando posteriormente su efectividad antimicrobiana sobre las bacterias *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Streptococcus pyogenes*.

Los extractos presentaron colores que variaron del ámbar claro al café oscuro, encontrándose un rendimiento en sólidos solubles totales superior en los etanólicos que en los acuosos.

Se identificaron como metabolitos: lactonas, saponinas, fenoles, triterpenos, taninos, alcaloides, flavonoides, sustancias aminadas y leucoantocianidinas, estas últimas sólo en los extractos acuosos.

La efectividad antimicrobiana de los extractos depende del solvente empleado, la procedencia del propóleo y de la especie bacteriana evaluada, siendo los extractos etanólicos los más efectivos, en particular los obtenidos de propóleos procedentes de Hampolol. La especie bacteriana más sensible resultó ser la *P. aeruginosa* y la *S. typhi* la más resistente.

PALABRAS CLAVES: propóleo, extractos etanólicos, extractos acuosos, actividad antibacteriana, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*.

ABSTRACT

Among products that may be obtained from beehives, wax, honey, royal jelly and propolis are prime examples. Propolis is a resin of complex composition that contains balsams, ethereal oils, vitamins, as well as several types of minerals and proteins. Due to the wide range of biological properties that this chemical compound possesses, it may be considered as being of great interest for therapeutic means.

For this reason, in this paper, ethanol and aqueous solution extracts of propolis from representative areas of Campeche, Mexico, were characterised.

The antimicrobial effectiveness of these substances was tested on *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Streptococcus pyogenes* bacteria.

The extracts presented colours that varied from clear amber to dark brown. Higher yields of total soluble solids were achieved from ethanol solutions, in comparison with the aqueous variety. The metabolites: lactones, saponins, phenols, triterpenoids, tannins, alkaloids, flavonoids, amines and leucoantocianidins were identified, with the last of these being present in the aqueous extracts only.

The antimicrobial effectiveness of the extracts depends on; the solvent used in the extraction, the origin of the propolis, and on the species of bacteria evaluated. Ethanol extract solutions were most effective, in particular those obtained from Hampolol Propolis. P. aeruginosa was found to be the most sensitive bacteria and S. typhi the most resistant.

KEY WORDS: propolis, ethanol extract solution, aqueous extract solution, antimicrobial effectiveness, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*.

INTRODUCCIÓN

El propóleo es una sustancia compleja, constituida por una gran variedad de compuestos químicos, su composición no es estable y varía según la fuente de procedencia, se caracteriza por tener un 55% de resinas y bálsamos aromáticos, 30% de ceras, 10% de aceites esenciales y 5% granos de polen^{1,2}.

Algunos autores plantean la existencia de alrededor de 18 componentes³ y se señala que entre estos los principales son compuestos del tipo flavonoide, tales como, las flavonas, flavones y las flavononas.

Se han reportado alrededor de 38 flavonas, 12 derivados del ácido benzoico, 14 derivados del alcohol cinámico y el ácido cinámico, 12 componentes entre alcoholes, cetonas y fenoles, 7 terpenos, 11 esteroides, 7 azúcares y 2 aminoácidos⁴.

Una de las propiedades más importante del propóleo es su actividad antimicrobiana, la cual se le atribuye fundamentalmente a los flavonoides².

Los extractos de propóleo han sido evaluado sobre bacterias grampositivas y gramnegativas, encontrándose una mayor efectividad sobre las primeras⁵.

Como puede observarse el propóleo dada su acción antimicrobiana es una sustancia de grandes potencialidades para el tratamiento de afecciones provocadas por diferentes microorganismos y para otras aplicaciones. Por otra parte si se tiene en cuenta que en el estado de Campeche, México, la Apicultura es una de las actividades económicas más importantes, la alternativa de conocer las propiedades del propóleo de esta región para impulsar su aprovechamiento es un aspecto de gran interés.

Estos elementos constituyeron el motivo para la realización de este trabajo, planteándose los siguientes objetivos:

Caracterizar en forma general los extractos acuosos y alcohólicos de las muestras de propóleos de Campeche utilizando técnicas de identificación de los principales metabolitos presentes en los mismos, comparar los rendimientos de

INTRODUCTION

Propolis is a complex substance constituting a great variety of chemical compounds. Its composition is unstable and varies in accordance with the source from which it is collected. It is characterised for having 55% of resins and aromatic balsams, 30% of waxes, 10% of essential oils and 5% of pollen grains^{1,2}.

Some authors have considered the existence of as many as 18 components³, among which the most numerous are flavonoid type compounds, such as flavon, flavones and flavonones.

Approximately 38 flavons have been reported, 12 derived from benzoic acid, 14 from cinnamic alcohol and cinnamic acid, 12 components among alcohols, ketones and phenols, 7 terpenes, 11 steroids, 7 sugars and 2 aminoacids⁴.

One of the most important properties of propolis is its antimicrobial activity which is fundamentally attributed to the flavonoids².

Propolis extracts have been evaluated on gram-positive and gram-negative bacteria where greater effectiveness was found to exist on the former⁵.

Due to the antimicrobial action of propolis, this substance has great potential in the treatment of complaints caused by varying microorganisms and in other applications. Furthermore, given that apiculture constitutes one of the most widespread economic activities in the state of Campeche, Mexico, it would be of great interest to discover what the specific properties of propolis from this region are, and to thereby promote the full exploitation of this area's natural resource.

These two considerations constitute the foundations for carrying out this study, whose objectives are outlined as follows:

To generally characterise the aqueous and alcoholic solution extracts from propolis samples gathered from Campeche using identification techniques of the main metabolites, compare the yields of soluble substances obtained with the two solvents and compare the antimicrobial activity of the different extracts on gram-positive (*Streptococcus pyogenes* and *Staphylococcus*

sustancias solubles obtenidos con los dos solventes y comparar la actividad antimicrobiana de los distintos extractos sobre bacterias gram-positivas (*Streptococcus pyogenes* y *Staphylococcus aureus*) y gramnegativas (*Salmonella typhi*, y *Pseudomonas aeruginosa*), tomando en cuenta la procedencia del propóleo, el tipo de solvente empleado y la especie bacteriana evaluada.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de muestras de propóleos

La colecta de propóleos se realizó durante la época de castración de las colmenas, seleccionando distintos lugares del Estado de Campeche, tomando como base la estratificación del estado en 3 zonas ecológicas diferentes con relación al tipo de vegetación predominante, según Aranda y Col ⁶.

Los propóleos colectados se identificaron con un número de acuerdo al lugar de procedencia, mostrándose en la tabla 1 esta denominación y señalándose además el tipo de vegetación correspondiente a cada uno de ellos.

aureus) and gram-negative bacteria (*Salmonella typhi*, and *Pseudomonas aeruginosa*). The origin of the propolis, the type of solvent used and the bacterial species evaluated were all taken into consideration.

MATERIALS AND METHODS

Collection of propolis samples

Propolis samples were gathered during the harvesting season of the beehives selected from different areas within the state of Campeche. The stratification of the state into 3 different ecological zones on the basis of predominant vegetation was carried out in accordance with Aranda & Col ⁶.

The propolis collected was identified with a number coinciding with its place of origin. This information is revealed in Table 1, together with the local vegetation corresponding to each area.

TABLA I. Lugar de procedencia de las muestras de propóleos y el tipo de vegetación predominante.

DENOMINACION DE LA MUESTRA	LUGAR DE PROCEDENCIA	TIPO DE VEGETACION
1	PIXTUM I	SELVA ALTA SUBPERENNIFOLIA
2	CHINÁ	SECUNDARIA CON SABANA
3	CHAMPOTÓN	SELVA MEDIANA
4	PIXTUM II	SELVA ALTA SUBPERENNIFOLIA
5	HAMPOLOL I	SELVA BAJA CADUCIFOLIA
6	CALKINI	SELVA BAJA CADUCIFOLIA
7	HAMPOLOL II	SELVA BAJA CADUCIFOLIA
8	TENABO	SECUNDARIA CON SABANA
9	DZIBALCHÉN	SECUNDARIA CON SABANA
10	POCYAXUM	SELVA MEDIANA

TABLE I. Origin of the samples and predominant vegetation types.

NAME OF SAMPLE	PLACE OF ORIGIN	TYPE OF VEGETATION
1	PIXTUM I	HIGH SEMIEVERGREEN FOREST
2	CHINÁ	SECONDARY/GRASSLANDS
3	CHAMPOTÓN	MEDIUM SEMIEVERGREEN FOREST
4	PIXTUM II	HIGH SEMIEVERGREEN FOREST
5	HAMPOLOL I	LOW DECIDUOUS FOREST
6	CALKINI	LOW DECIDUOUS FOREST
7	HAMPOLOL II	LOW DECIDUOUS FOREST
8	TENABO	SECONDARY/GRASSLANDS
9	DZIBALCHÉN	SECONDARY/GRASSLANDS
10	POCYAXUM	MEDIUM SEMIEVERGREEN FOREST

Cada muestra se obtuvo colectando el propóleo de manera que se reuniera un total que osciló entre 150 - 500 g, tomando el cuidado de que esa cantidad proviniera del mayor número de colmenas posibles del apiario.

Preparación de extractos acuosos y alcohólicos

Se pesaron 20 gramos de propóleo, el cual se transfirió a un matraz balón de 250 mL y se le añadieron 200 mL de etanol al 80 % o agua según el extracto que se pretendía obtener y se sometió a reflujo en un equipo soxhlet durante una hora, al cabo de ese tiempo se detuvo el reflujo y se filtró a través de papel de filtro Whatman No.40, se separó el filtrado y el sólido residual se sometió nuevamente a reflujo con 200 mL del solvente correspondiente, el nuevo filtrado obtenido se reunió con el anterior, siendo este total el extracto final. La preparación de estos extractos se realizó por triplicado.

Determinación del color de los extractos: se realizó visualmente

Determinación de rendimiento de sustancias solubles totales.

Each sample was obtained by collecting the propolis in such a way that the total amount gathered oscillated between 150 - 500g. Care was taken to ensure that this amount had been collected from the highest number of hives possible within the apiary.

Preparation of the aqueous and alcoholic extraction solutions

20 grams of propolis were taken and put into a ball flask of 250 ml to which 200mL of ethanol at 80% or water (according to the type of extract required) were added. The mixture was subsequently subjected to reflexion in a soxhlet apparatus for one hour. Reflexion was then stopped and the contents were filtered through Whatman No.40 filter paper. The residual solid was again subjected to reflexion with 200 mL of corresponding solvent. The newly obtained filtered product was mixed with the earlier product to produce the final extract. The preparation of these extracts was triplicated.

Determination of the colour of the extracts: carried out visually.

Los extractos totales finales se transfirieron al matraz de un rotavapor tipo Büchi y se mantuvieron en evaporación hasta la desaparición del solvente. El sólido obtenido se sometió a secado en estufa a 70 °C durante 2 horas, para obtener el denominado extracto blando total.

El calculo del rendimiento de cada una de las réplicas obtenidas para los diez tipos de propóleos estudiados, se realizó empleando la siguiente ecuación:

$$\text{Rendimiento (\%)} = P.100/m .$$

Donde P es el peso de extracto seco (g) y m es el peso de muestra (g)

Recuperación del extracto soluble total con etanol al 60% y agua destilada.

Los sólidos solubles obtenidos se recuperaron empleando agua destilada para los acuosos y etanol al 60% para los alcohólicos, preparando soluciones cuya concentración se ajustó en todos los casos a 30 mg/mL.

Caracterización química de los extractos de propóleos:

Para la identificación de los distintos grupos de metabolitos presentes en los extractos de propóleos se emplearon las técnicas y el procedimiento para el tamizaje fotoquímico descrito por Durand y col⁷.

Evaluación de la actividad Antimicrobiana

Los microorganismos empleados en este estudio pertenecen al cepario del Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Campeche y fueron donados por la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, los cuales son cepas certificadas por el CDC de Atlanta (Control Disease Center) y fueron los siguientes: *S. aureus* ATCC 25923, *S. pyogenes* BUAP (Benemérita Universidad Autónoma de Puebla) 73201, *P. aeruginosa* ATCC 15442, *S. typhi* ATCC 7251. Las cepas se encuentran conservadas en refrigeración a 4°C en gelosa especial (marca BBL).

Antes de realizar la determinación del efecto antimicrobiano de los diferentes extractos de propóleos, se verificó la viabilidad cada una de las bacterias seleccionadas para este trabajo.

Determination of the total yield of soluble substances.

The total extracts were put into a Büchi type rotavapor flask and evaporation was continued until disappearance of the solvents. The resulting solid was subjected to drying in a heater at 70 °C for 2 hours in order to obtain the so called total soft extract.

The calculation of yield, for each of the replicates obtained for the ten types of propolis studied, was carried out using the following equation:

$$\text{Yield (\%)} = P.100/m.$$

Where P is the weight of the dried extract (g) and m is the weight of the sample (g)

Recovery of the total soluble extract with ethanol at 60% and distilled water.

The soluble solids obtained were recovered using distilled water for the aqueous variety and ethanol at 60% for the alcohol type. Solution concentrations in all cases were prepared at 30 mg/mL.

Chemical characterisation of the propolis extracts:

In order to identify the different groups of metabolites present in the extracts, the techniques and photochemical sieving procedures were performed as described by Durand & Col⁷.

Evaluation of Antimicrobial activity

The micro-organisms used in this study belonged to the strain bank at the Department of Microbiology at the Faculty of Chemical Biological Sciences of the Universidad Autónoma de Campeche and were donated by the Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. The strains are certified by CDC in Atlanta (Center for Disease Control) and were as follows: *S. aureus* ATCC 25923, *S. pyogenes* BUAP (Benemérita Universidad Autónoma de Puebla) 73201, *P. aeruginosa* ATCC 15442, *S. typhi* ATCC 7251. The strains are kept under refrigeration at 4°C in special gel (BBL).

Prior to carrying out the determination of the antimicrobial effects of the different propolis extracts, the suitability of the selected bacteria for the purposes of the work was verified. The

La evaluación del efecto microbicida de los diferentes extractos sobre las especies bacterianas, se realizó empleando el método de Inhibición Mínima Microbicida reportado por Chiong y col⁸. y modificado por Rojas⁹ que consistió en:

Se preparó una serie de tubos en la cual el primero contenía 2 mL de caldo nutritivo a doble concentración y los demás contenían la misma cantidad de caldo a simple concentración.

Al primer tubo se le añadieron 2 mL de extracto de propóleo al 3% (30 mg/mL) de éste se tomó una alícuota de 2 mL que se añadió al tubo siguiente y así se procedió sucesivamente con los tubos restantes hasta desechar los últimos 2 mL. De esta forma la concentración del extracto de propóleo en cada tubo queda según se muestra en la siguiente tabla.

evaluation of the microbicidal effect of the different extracts on the bacterial species was determined using the Microbial Minimal inhibitory method described by Chiong & Col⁸ modified by Rojas⁹, and was performed as follows:

A series of tubes were prepared, where the first of which contained 2mL culture medium at double concentration and the remainder, contained the same quantity of medium at simple concentrations.

To the first tube, 2mL of extract of propolis at 3% (30mg/mL) was added. From this tube an aliquot of 2mL was taken and added to the following tube. The process was successively repeated until the last 2mL of the dissolution had been used up. The concentration levels of the propolis extract in each of the tubes is shown in the following table:

TABLA II. Concentraciones del extracto de propóleo obtenidas en las diferentes diluciones.

Tubos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	control
Dilución	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/12	1/25	1/52	1/102	1/204	
Concentración (mg/mL)	15	7.5	3.75	1.87	0.93	0.46	0.23	0.11	0.05	0.02	0.01	0

TABLE II. Concentration levels of propolis extract obtained in the different dissolutions.

Tubes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	control
Dissolution	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/12	1/25	1/52	1/102	1/204	
Concentration (mg/mL)	15	7.5	3.75	1.87	0.93	0.46	0.23	0.11	0.05	0.02	0.01	0

Con el objetivo de descartar el efecto del etanol sobre las bacterias estudiadas, se preparó paralelamente una serie con la misma cantidad de tubos, pero en lugar de la solución de propóleo en el primer tubo se añadió 2 mL de una solución de etanol al 60%, realizándose a continuación las diluciones correspondientes, además se realizó un control con agua destilada.

A cada tubo se le inoculó 0.1 mL de la suspensión bacteriana cuya concentración correspondía al tubo no.3 de la escala de Mc Farland (9×10^8

So as to be able to disregard the effect of ethanol on the bacteria studied, a series of the same number of tubes was prepared in parallel, to which 2mL of ethanol at 60% was added to the first and the corresponding successive dilutions were added in the same way as before. A control series was also performed using distilled water.

Each tube was inoculated with 0.1mL of the bacterial suspension whose concentration corresponded to tube No.3 on the McFarland scale (9×10^8

células/mL) y se incubaron a 37 ° C durante 24 horas. Posteriormente se tomó una asada de cada uno de ellos y se inocularon en los medios de cultivo adecuados: agar sal y manitol (marca Bioxon) para *S. aureus*, agar sangre de carnero (marca Bioxon) para *S. pyogenes*, agar McConkey (marca Bioxon) para *P. aeruginosa*, y agar salmonella shigella (marca Merck) para *S. typhi* y se incubaron 24 horas a 37°C, al cabo de ese tiempo se observó si había crecimiento o no.

Se tomó como Concentración Mínima Inhibitoria, la menor de aquellas donde no hubo crecimiento en las placas.

Recursos Estadísticos

Los rendimientos promedios de sólidos solubles totales de las tres réplicas realizadas tanto para los extractos etanólicos y acuosos de los diez propóleos estudiados, se compararon empleando la prueba t de Student para medias con un nivel de confianza del 99%.

Con el objetivo de determinar la dependencia de la actividad antimicrobiana, con la procedencia de los propóleos, el tipo de extracto (etanólico o acuoso) y la especie bacteriana sobre la cual actúan los mismos, se utilizó un diseño estadístico trifactorial con tres repeticiones para cada experimento, procesándose los resultados mediante un análisis de varianza con un nivel de significancia del 99%. Las tres réplicas señaladas corresponden a los tres extractos referidos anteriormente tanto para el caso donde se emplea etanol como solvente y agua.

Al detectarse diferencias se utilizó una prueba de rangos Múltiples de Duncan para el ordenamiento de los promedios.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De la determinación de color y el rendimiento de sustancias solubles totales para las diferentes muestras de propóleos empleando etanol y agua como solventes.

En la tabla 3 se muestran los resultados obtenidos en cuanto al color y el porcentaje de sólidos solubles totales (rendimiento) en ambos extractos.

cells/mL) and was incubated at 37 ° C for 24 hours. Subsequently, a loop was taken from each of them and inoculated into the appropriate cultures: Mannitol salt agar (Bioxon) for *S. aureus*, sheep blood agar (Bioxin) for *S. pyogenes*, McConkey agar (Bioxin) for *P. aeruginosa*, and salmonella shigella agar (Merck) for *S. typhi* were incubated for 24 hours at 37°C. After such time, it could be determined whether growth had taken place or not.

Minimum inhibitory concentration was considered as the lesser of those where no growth had taken place.

Statistical resources

The average yields of the total soluble solids of the three replicates, carried out on both the ethanol and aqueous extracts of the ten propolis samples studied, were compared using the Student t test for averages with a degree of reliability of 99%.

In order to determine whether a relationship between antimicrobial activity and the origin of propolis exists, a three factor statistical test with three repetitions for each experiment was designed to evaluate the type of extract solution (ethanol or aqueous) and the species of bacteria upon which they acted. The results were processed through a variance analysis with a level of significance of 99%. The three replicates indicated corresponded to the three extracts referred to previously, both where ethanol was employed as solvent and where water was.

On detecting differences, a Duncan multiple range test was used in order to carry out the sequencing of the averages.

RESULTS AND DISCUSSION

The determination of colour and yields of the total soluble substances for the different samples of propolis using ethanol and water as solvents.

Table 3 shows the results obtained as much for colour as for percentage of total soluble solids (yields) in both extracts.

TABLA III. Resultados de la determinación del color y los rendimientos de los extractos etanólicos y acuosos de los propóleos de Campeche.

MUESTRA	COLOR DE LOS EXTRACTOS	RENDIMIENTO DE LOS EXTRACTOS (%)			
		ETANOLICOS	D.E.	ACUOSOS	D.E.
1	PARDO	21.9	0.88	16.22	0.57
2	AMARILLO	9.63	0.76	6.72	0.42
3	ROJO	19.61	0.93	15.13	0.81
4	AMARILLO	9.17	0.68	5.11	0.61
5	CAFÉ OSCURO	22.11	0.95	12.47	0.76
6	AMBAR	12.35	0.45	5.86	0.39
7	CAFÉ OSCURO	18.52	0.10	8.91	0.52
8	AMBAR CLARO	18.04	0.93	13.94	0.77
9	AMBAR CLARO	11.37	0.73	8.8	0.46
10	AMARILLO	6.66	0.44	3.69	0.28

TABLE III. Results of colour determination and yields of ethanol and aqueous solution extracts of propolis from Campeche.

SAMPLE	COLOUR OF EXTRACTS	YIELDS OF EXTRACTOS (%)			
		ETHANOLS	D.E.	AQUEOUS	D.E.
1	BROWNISH GREY	21.9	0.88	16.22	0.57
2	YELLOW	9.63	0.76	6.72	0.42
3	RED	19.61	0.93	15.13	0.81
4	YELLOW	9.17	0.68	5.11	0.61
5	DARK BROWN	22.11	0.95	12.47	0.76
6	AMBER	12.35	0.45	5.86	0.39
7	DARK BROWN	18.52	0.10	8.91	0.52
8	CLEAR AMBER	18.04	0.93	13.94	0.77
9	CLEAR AMBER	11.37	0.73	8.8	0.46
10	YELLOW	6.66	0.44	3.69	0.28

Como se observa hay una variación en los colores obtenidos, los cuales van desde el ámbar claro al café oscuro, pasando por el amarillo, el pardo y rojo. Esta variación era esperada ya que según Asis² la coloración de los propóleos depende de la vegetación existente en las zonas donde se ubican las colmenas.

En cuanto a los rendimientos de manera general se obtuvieron valores superiores en el total de sólidos solubles extraídos con el etanol que al utilizar agua como solvente, lo cual se corrobora al encontrarse una diferencia significativa entre los mismos al aplicar la prueba t de Student con un 99% según se muestra en la tabla 4.

A variation in the colours obtained may be observed, ranging from clear amber to a dark brown like colour on the one hand to yellow, brownish grey and red on the other. This colour variation was as expected given that according to Asis², the colouring of propolis depends on existing vegetation in the areas where the beehives are to be found.

Concerning yields in general, higher values in total soluble solids extracted with ethanol were obtained in comparison with those obtained when water was used as solvent. This finding is corroborated after applying the student t test with 99% reliability, where a significant difference

TABLA IV. Resultados obtenidos al realizar la comparación de los rendimientos mediante el estadígrafo t de Student

Tipo de extracto	Valor promedio	Varianza (S^2)	F	t_{CAL}
Etanólico	14.94	32.62	1.63 n.s	2.2894***
Acuoso	9.69	19.19		

n.s - no significativo

*** significativo con un nivel de confianza del 99%

TABLE IV. Results obtained on comparison of the yields through the Student's t statistical graph.

Type of extract	Average value	Variance (S^2)	F	t_{CAL}
Ethanol	14.94	32.62	1.63 n.s	2.2894***
Aqueous	9.69	19.19		

n.s = not significant

*** significant with a degree of reliability of 99%.

En cuanto a los resultados obtenidos de la determinación cualitativa de los grupos químicos predominantes en los extractos de propóleos de Campeche se puede observar en las tablas 5 y 6, que los metabolitos presentes en ambos extractos son:

lactonas, saponinas, fenoles y taninos, flavonoides, triterpenos, esteroides, alcaloides y en menor proporción los grupos aminos.

De los metabolitos anteriores es conocido que a la mayoría de los flavonoides y fenoles se les atribuye la acción antibacteriana^{2,3,8} por lo cual la detección de ellos resulta realmente interesante para los fines de la efectividad microbicida de los extractos obtenidos.

between the two was found to exist. These results are shown in table 4.

Tables 5 & 6 reveal the qualitative results obtained on the determination of the predominant chemical groups in propolis extracts from Campeche. The metabolites present in both extracts were as follows:

lactones, saponines, phenoles and tannins, flavonoids, triterpenes, steroids, alkaloids and to a lesser extent the amine groups.

It is an already established fact that, of these metabolites, antibacterial action is attributed to the majority of the flavonoids and phenoles^{2,3,8}. The detection of these metabolites is therefore a finding of great interest for the purposes of testing these extracts for microbicidal effectiveness.

TABLA V. Resultados de la identificación de metabolitos presentes en las tres réplicas de extractos etanólicos obtenidos de los propóleos procedentes de las diferentes localidades de Campeche

Extracto	Lactonas	Saponinas	Fenoles y Taninos.	Sustancias aminadas	Leuantociandinas	Flavonoides	Quinonas	Tritpernos y Esteroides	Alcaloides.	Cardenolidos
1	+++	+++	+++	---	---	+++	---	---	---	---
2	+++	+++	+++	---	---	+++	---	---	---	---
3	+++	+++	+++	---	---	+++	---	+++	+++	---
4	+++	+++	+++	---	---	+++	---	-	+++	---
5	+++	+++	+++	---	---	+++	---	+++	+++	---
6	+++	+++	+++	+++	---	+++	---	+++	---	---
7	+++	+++	+++	---	---	+++	---	+++	+++	---
8	+++	+++	+++	---	---	+++	---	+++	+++	---
9	+++	+++	+++	+++	---	+++	---	+++	+++	---
10	+++	+++	+++	---	---	+++	---	+++	+++	+++

+ --- representa resultado positivo en la prueba (presencia del metabolito)

- --- representa resultado negativo en al prueba (ausencia del metabolito)

TABLE V. The results of the identification of the metabolites present in the three replicates of extracts with ethanol obtained from propolis from different areas of Campeche.

Extract	Lactones	Saponines	Phenols & Tannins	amine substances		Flavonoids	Quinones	Tritperns & steroids	Alkaloids	Cardenolids
1	+++	+++	+++	---	---	+++	---	---	---	---
2	+++	+++	+++	---	---	+++	---	---	---	---
3	+++	+++	+++	---	---	+++	---	+++	+++	---
4	+++	+++	+++	---	---	+++	---	-	+++	---
5	+++	+++	+++	---	---	+++	---	+++	+++	---
6	+++	+++	+++	+++	---	+++	---	+++	---	---
7	+++	+++	+++	---	---	+++	---	+++	+++	---
8	+++	+++	+++	---	---	+++	---	+++	+++	---
9	+++	+++	+++	+++	---	+++	---	+++	+++	---
10	+++	+++	+++	---	---	+++	---	+++	+++	+++

+ --- signifies a positive result in the test (presence of the metabolite)

- --- signifies a negative result in the test (absence of the metabolite)

TABLA VI. Resultados de la identificación de metabolitos presentes en las tres réplicas de extractos acuosos obtenidos de los propóleos procedentes de diferentes localidades de Campeche.

Extracto	Lactonas	Saponinas	Fen.oles y Tanninos.	Sustancias aminadas	Leuantocianidinas	Flavonoides	Quinonas	Tritpernos y Esteroides	Alcaloides.	Cardenolidos
1	+++	+++	+++	---	+++	+++	---	+++	+++	---
2	+++	+++	+++	-	+++	+++	---	+++	+++	---
3	+++	+++	+++	+++	+++	+++	---	+++	+++	---
4	+++	+++	+++	---	+++	+++	---	+++	+++	---
5	+++	+++	+++	---	+++	+++	---	+++	+++	---
6	+++	+++	+++	+++	+++	+++	---	+++	+++	---
7	+++	+++	+++	---	+++	+++	---	+++	+++	---
8	+++	+++	+++	---	+++	+++	---	+++	+++	---
9	+++	+++	+++	---	+++	+++	---	+++	+++	---
10	+++	+++	+++	---	+++	+++	---	+++	+++	---

+ --- representa resultado positivo en la prueba (presencia del metabolito)

- --- representa resultado negativo en la prueba (ausencia del metabolito)

TABLE VI. The results of the identification of the metabolites present in the three replicates of extracts with aqueous solutions obtained from propolis from different areas of Campeche.

Extract	Lactones	Saponines	Phenols & Tannins	Amine substances	Leuantocianidins	Flavonoids	Quinones	Tritperns & steroids	Alkaloids	Cardenolids
1	+++	+++	+++	---	+++	+++	---	+++	+++	---
2	+++	+++	+++	-	+++	+++	---	+++	+++	---
3	+++	+++	+++	+++	+++	+++	---	+++	+++	---
4	+++	+++	+++	---	+++	+++	---	+++	+++	---
5	+++	+++	+++	---	+++	+++	---	+++	+++	---
6	+++	+++	+++	+++	+++	+++	---	+++	+++	---
7	+++	+++	+++	---	+++	+++	---	+++	+++	---
8	+++	+++	+++	---	+++	+++	---	+++	+++	---
9	+++	+++	+++	---	+++	+++	---	+++	+++	---
10	+++	+++	+++	---	+++	+++	---	+++	+++	---

+ --- signifies a positive result in the test (presence of the metabolite)

- --- signifies a negative result in the test (absence of the metabolite)

Las leucoantocianidinas solo se detectaron en los extractos acuosos, lo cual es un resultado lógico si se toma en cuenta que éstos compuestos son más solubles en agua que en solventes orgánicos, por otra parte éste resultado es importante ya que este grupo de sustancias pueden ser las responsables de la actividad bactericida de los extractos acuosos.

Con relación a la efectividad antimicrobiana en la tabla 7 y 8 se muestran los resultados de los valores de Concentración Mínima Bactericida (CMB) para las diferentes especies bacterianas, empleando los extractos alcohólicos y acuo-

The leucoantocianidins were only detected in aqueous solution extracts. This is represents a logical finding if we consider that these compounds are more soluble in aqueous than in organic solvents. On the other hand, this represents an important finding, given that this group of substances may be responsible for the bactericidal activity in aqueous solution extracts.

With regard to antimicrobial effectiveness, table 7 & 8 reveal Minimum Bactericidal Concentration (MBC) values for each of the different species of bacteria, using alcohol and aqueous solution extracts of propolis gathered from different areas within the State of Campeche.

Los resultados de los propóleos colectados en diferentes lugares del Estado de Campeche.

Como se muestra en esta tabla las concentraciones requeridas para inhibir a las bacterias fue menor para los extractos etanólicos que para los acuosos, lo que indica que los primeros son más efectivos.

The results shown in the table demonstrate that the concentrations required to inhibit the bacteria were lower in the case of ethanol solution extracts than that of the aqueous solution extracts, thus indicating that the former are more effective.

TABLA VII Valores de la concentración mínima bactericida obtenidos al evaluar las tres réplicas los extractos etanólicos obtenidos de los diferentes propóleos sobre *S. pyogenes* y *S. aureus*; *S. typhi*, y *P. aeruginosa*.

Procedencia del propóleo	Concentración mínima bactericida (mg/ml)											
	<i>S. aureus</i>			<i>S. pyogenes</i>			<i>P. aeruginosa</i>			<i>S. typhi</i>		
1	3.75	3.75	3.75	1.87	3.75	3.75	1.87	1.87	1.87	3.75	3.75	3.75
2	3.75	3.75	3.75	1.87	3.75	3.75	1.87	1.87	1.87	3.75	3.75	7.5
3	1.87	1.87	1.87	3.75	3.75	3.75	1.87	0.93	0.93	7.5	7.5	7.5
4	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	1.87	3.75	1.87	7.5	7.5	7.5
5	0.93	0.93	0.93	3.75	3.75	3.75	3.75	1.87	1.87	3.75	3.75	3.75
6	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	1.87	3.75	3.75	3.75
7	0.93	1.87	1.87	0.93	0.93	0.93	0.93	1.87	1.87	3.75	3.75	3.75
8	1.87	1.87	1.87	1.87	1.87	1.87	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75
9	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	1.87	7.5	7.5	7.5
10	1.87	1.87	1.87	1.87	1.87	1.87	3.75	3.75	3.75	7.5	7.5	7.5

TABLE VII. Minimum bactericidal concentration values obtained after evaluating the three replicates of ethanol solution extracts of the different propolis samples on *S. pyogenes* and *S. aureus*; *S. typhi*, and *P. aeruginosa*.

Origin of propolis	Minimum bactericidal concentration (mg/mL)											
	<i>S. aureus</i>			<i>S. pyogenes</i>			<i>P. aeruginosa</i>			<i>S. typhi</i>		
1	3.75	3.75	3.75	1.87	3.75	3.75	1.87	1.87	1.87	3.75	3.75	3.75
2	3.75	3.75	3.75	1.87	3.75	3.75	1.87	1.87	1.87	3.75	3.75	7.5
3	1.87	1.87	1.87	3.75	3.75	3.75	1.87	0.93	0.93	7.5	7.5	7.5
4	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	1.87	3.75	1.87	7.5	7.5	7.5
5	0.93	0.93	0.93	3.75	3.75	3.75	3.75	1.87	1.87	3.75	3.75	3.75
6	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	1.87	3.75	3.75	3.75
7	0.93	1.87	1.87	0.93	0.93	0.93	0.93	1.87	1.87	3.75	3.75	3.75
8	1.87	1.87	1.87	1.87	1.87	1.87	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75
9	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	1.87	7.5	7.5	7.5
10	1.87	1.87	1.87	1.87	1.87	1.87	3.75	3.75	3.75	7.5	7.5	7.5

TABLA VIII. Valores de la concentración mínima bactericida obtenidos al evaluar las tres réplicas los extractos acuosos obtenidos de los diferentes propóleos sobre *S. pyogenes* y *S. aureus*; *S. typhi*, y *P. aeruginosa*.

Procedencia del propóleo	Concentración mínima bactericida (mg/ml)											
	<i>S. aureus</i>			<i>S. pyogenes</i>			<i>P. aeruginosa</i>			<i>S. typhi</i>		
1	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	15	15	15	15	15	15
2	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	15	15	15	15	15	15
3	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	15	15	15	15	15	15
4	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	15	15	15	15	15	15
5	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	15	15	15	15	15	15
6	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	15	15	15	15	15	15
7	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	15	15	15	15	15	15
8	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	15	15	15	15	15	15
9	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	15	15	15	15	15	15
10	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	15	15	15	15	15	15

TABLE VIII. Minimum bactericidal concentration values obtained after evaluating the three replicates of aqueous solution extracts of the different propolis samples on *S. pyogenes* and *S. aureus*; *S. typhi*, and *P. aeruginosa*.

Origin of propolis	Minimum bactericidal concentration (mg/mL)											
	<i>S. aureus</i>			<i>S. pyogenes</i>								
1	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	15	15	15	15	15	15
2	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	15	15	15	15	15	15
3	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	15	15	15	15	15	15
4	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	15	15	15	15	15	15
5	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	3.75	15	15	15	15	15	15
6	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	15	15	15	15	15	15
7	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	15	15	15	15	15	15
8	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	15	15	15	15	15	15
9	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	15	15	15	15	15	15
10	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5	15	15	15	15	15	15

Por otra parte los resultados del análisis de varianza del diseño trifactorial (tabla 9) nos demuestran que los tres factores estudiados, así como sus interacciones resultaron significativos con un nivel de confianza del 99%, lo que implica que tanto la procedencia del propóleo, el tipo de extracto utilizado, así como la especie de microorganismo evaluado determinan la efectividad antimicrobiana del propóleo.

The results of the variance analysis of triple factor design (table 9) show that the three factors studied, together with the interactions between them, produce significant results with a degree of reliability of 99%. This finding demonstrates that propolis origin, the type of extract used, as well as the species of microorganism evaluated are determinate factors in the evaluation of propolis antimicrobial effectiveness.

TABLA IX. Resultados del análisis realizado al diseño trifactorial para estimar la efectividad bactericida de los extractos de propóleos de diferentes localidades de Campeche

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de Cuadrados.	Cuadrado Medio	F
Tratamiento	79	6027.88	76.3	482.94***
Tipo de extracto (A)	1	3620.2	3620.2	22913.29***
Procedencia de propóleo (B)	9	77.06	8.56	54.20***
Tipo de cepa (C)	3	1240.76	413.59	2617.71***
A x B	9	39.43	4.38	27.73***
A x C	3	711.95	237.32	1502.05***
B x C	27	145.84	5.4	34.19***
A x B x C	27	192.64	7.13	34.187***
Error	160	25.27	0.158	
Total	239	6053.16		

*** Significativo al 99% de confianza F – Estadígrafo de Fisher
 Media general = 7.27 Coeficiente de variación = 5.47%
 Error estándar tratamiento = 0.2295 Error estándar A = 0.0363
 Error estándar B = 0.0811 Error estándar C = 0.0513
 Error estándar Ax B = 0.1147 Error estándar Ax C = 0.073
 Error estándar B x C = 0.1623

TABLE IX. Results of the analysis carried out, in accordance with the triple factor design, to estimate the bactericidal effectiveness of the propolis extracts from differing areas in Campeche.

Variation source	Degree of freedom	Addition of squares	Average square	F
Treatment	79	6027.88	76.3	482.94***
Type of extract (A)	1	3620.2	3620.2	22913.29***
Origin of propolis (B)	9	77.06	8.56	54.20***
Strain type (C)	3	1240.76	413.59	2617.71***
A x B	9	39.43	4.38	27.73***
A x C	3	711.95	237.32	1502.05***
B x C	27	145.84	5.4	34.19***
A x B x C	27	192.64	7.13	34.187***
Error	160	25.27	0.158	
Total	239	6053.16		

*** Significance at 99% reliability F - Fisher statistical graph
 General average = 7.27 Coefficient of variation = 5.47%
 Standard error treatment = 0.2295 Standard error A = 0.0363
 Standard error B = 0.0811 Standard error C = 0.0513
 Standard error Ax B = 0.1147 Standard error Ax C = 0.073
 Standard error B x C = 0.1623

A continuación se muestra manera gráfica el efecto por separado de los tres factores estudiados.

En la figura 1 se expone como la CMB promedio para los extractos etanólicos fue inferior (3.33 mg/mL) a la de los acuosos (11.16 mg/mL), demostrando este hecho la mayor efectividad de los primeros. Este resultado es aparentemente contradictorio debido a que en la etapa de detección de los metabolitos se comprobó que tanto los extractos acuosos como los etanólicos presentaban los mismos componentes, e incluso en los primeros se detectó un grupo de metabolitos adicional que fueron las leucoantocianidinas, por lo que pudiera esperarse una acción antimicrobiana similar o tal vez superior en el caso de los extracto obtenidos con agua.

The effect of the three factors studied are shown separately in graphic form below.

Figure 1 shows that the average MBC value for ethanol solution extracts was lower (3.33 mg/mL) than that for aqueous solutions (11.16 mg/mL), demonstrating therefore, the higher effectiveness of the first. This result is apparently contradictory, given that during the metabolite detection stage both the aqueous as well as the ethanol solution extracts presented the same components. Furthermore, in aqueous solution extracts, an additional group of metabolites the leucoantocianidinas were detected. This would therefore, lead us to believe that the antimicrobial activity in this case should be similar or perhaps even higher than that for ethanol solution extracts.

FIGURA 1. Concentración mínima bactericida promedio de los extractos etanólicos y acuosos.

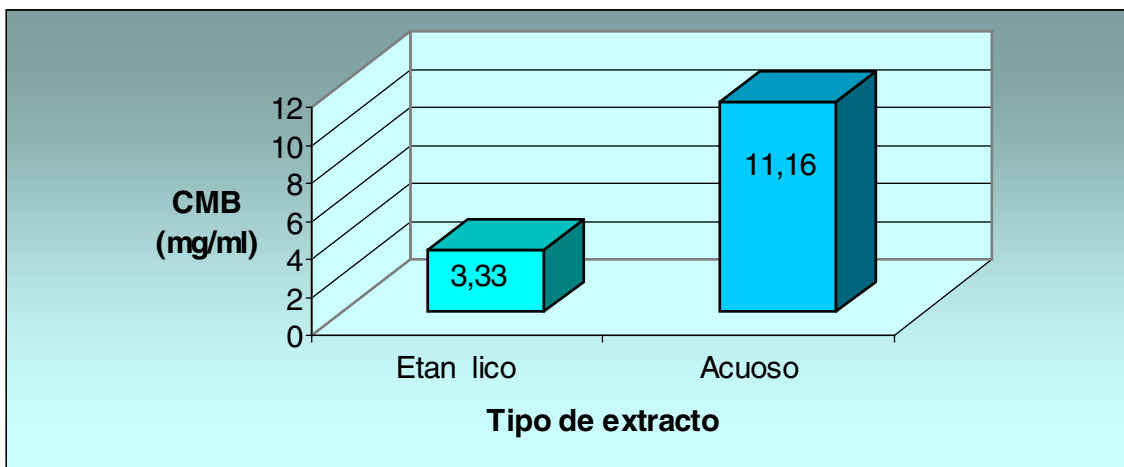
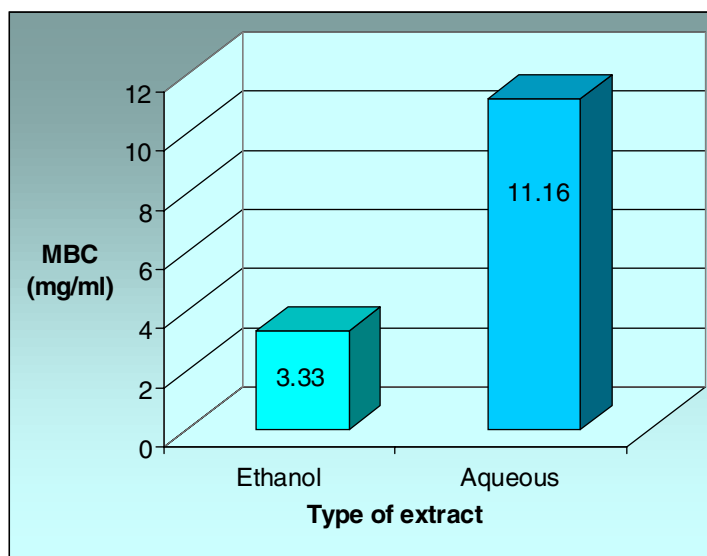


FIGURE 1. Average minimum bactericidal concentration of ethanol and aqueous solution extracts.



sin embargo hay que tener en cuenta que las soluciones preparadas a partir de los sólidos extraídos en el proceso de lixiviación se ajustaron a una concentración de 30 mg/ml en todos los casos y como los flavonoides son muy solubles en etanol al analizar por separado su concentración debe esperarse que este grupo de metabolitos se encuentre en mayor proporción en las soluciones etanólicas que en las acuosas y por lo tanto resulta lógico que su efectividad antibacteriana sea superior.

Por otra parte otro factor que puede estar determinando el resultado obtenido es el tipo de flavonoide presente en los extractos. En principio como se ha señalado el propóleo es una sustancia de composición compleja, en la cual se han detectado distintos tipos de flavonoides y otras sustancias^{3,4,10}, esto nos inclina a señalar que las diferencias detectadas en la acción antibacteriana de los extractos evaluados probablemente también este asociada a las diferencias en composición, lo cual requerirá de estudios posteriores para comprobar esta hipótesis.

En la figura 2 se visualiza el efecto del tipo de especie bacteriana sobre la cantidad de extracto requerida para inhibirla.

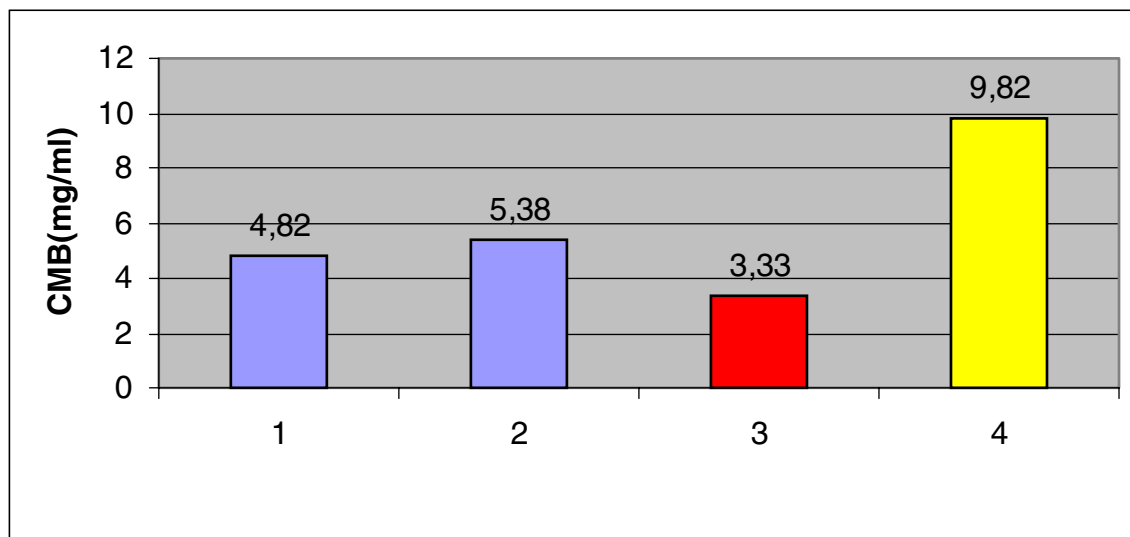
However, it should be taken into account that the solutions prepared from the solids extracted in the leaching process were set at a concentration of 30 mg/mL in all cases. On separate analysis of the concentrations, the flavonoids are found to be very soluble in ethanol. It is reasonable to expected therefore, that this group of metabolites should be encountered in higher proportions in ethanol rather than in aqueous solutions. Consequently, this would provide a logical explanation for the higher antibacterial activity found in this solution.

Conversely, another factor that may determine the result obtained is the type of flavonoid present in the extracts. In principle, as has already been pointed out, propolis is a substance of complex composition, in which different types of flavonoid and other substances have been detected^{3,4,10}. This leads us to believe that the differences detected in antimicrobial activity in the extracts evaluated may also be associated with differences in composition. Such a hypothesis would require further study.

Figure 2 shows the relationship between bacterial species and the quantity of extract required to inhibit its proliferation.

FIGURA 2. Concentraciones mínimas bactericidas promedio requeridas por especie bacteriana.

FIGURE 2. Average minimum bactericidal concentrations required per bacterial species.



Donde : 1: *S. aureus*, 2: *S. pyogenes*, 3: *P. aeruginosa* y 4: *S. typhi*.

where: 1: *S. aureus* 2: *S. aureus* 3: *P. aeruginosa* & 4: *S. typhi*.

De acuerdo a esta figura *S. typhi* resultó la especie bacteriana más resistente ya que se necesitó la mayor concentración promedio de los extracto para ser inhibida, lo cual era de esperar por tratarse de una bacteria gramnegativa.

Le siguieron en orden *S. aureus*, *S. pyogenes* y finalmente *P. aeruginosa* fue la más sensible.

El análisis de comparación de medias de Duncan realizados a los resultados anteriores confirman lo planteado con respecto a la sensibilidad de las cepas, tal y como se muestra en la tabla 9.

The results presented in this figure, show that the most resistant bacterial species was *S. typhi* given that this species required a higher average concentration in order to achieve inhibition. This result is to be expected due to the fact that this bacterium is gram-negative.

S. aureus, *S. pyogenes* followed in descending order with *P. aeruginosa* being the most sensitive of the group.

As observed in table 9, the analysis of the Duncan means comparison test, carried out on these results, confirm findings regarding the sensitivity of the strains.

TABLA IX. Resultados del ordenamiento de los valores promedio de la concentración mínima bactericida obtenidos para las diferentes especies bacterianas evaluadas.

CEPA	<i>S. typhi</i>	<i>S. pyogenes</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
No. de cepa	4	2	1	3
CMB(mg/mL)	9.81	5.38	4.80	3.33
ORDEN	a	b	c	d

TABLE IX. Sequencing of average values for minimum bactericidal concentrations obtained for the different bacterial species evaluated.

STRAIN	<i>S. typhi</i>	<i>S. pyogenes</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
Strain No.	4	2	1	3
MBC(mg/mL)	9.81	5.38	4.80	3.33
ORDER	a	b	c	d

Por último en la figura 3 se muestran los valores de las concentraciones mínimas inhibitorias promedios de que los propóleos, los de mayor actividad antimicrobiana resultaron los de Hampolol I y Hampolol II, y el menos efectivo es de Pocyaxum (7.97.mg/mL).

Finally, in figure 3, the values of the average minimum inhibitory concentrations of propolis samples may be observed. Those with the highest antimicrobial activity were found to be **Hampolol I** and **Hampolol II**, while the least effective was **Pocyaxum (7.97.mg/mL)**.

FIGURA 3. Valores de la Concentración mínima promedio de los propóleos de diferentes procedencias.

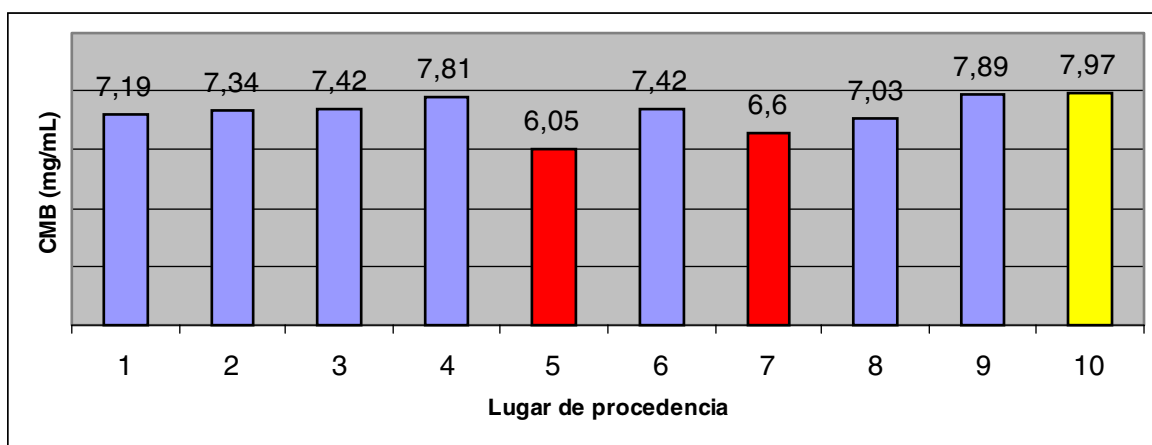
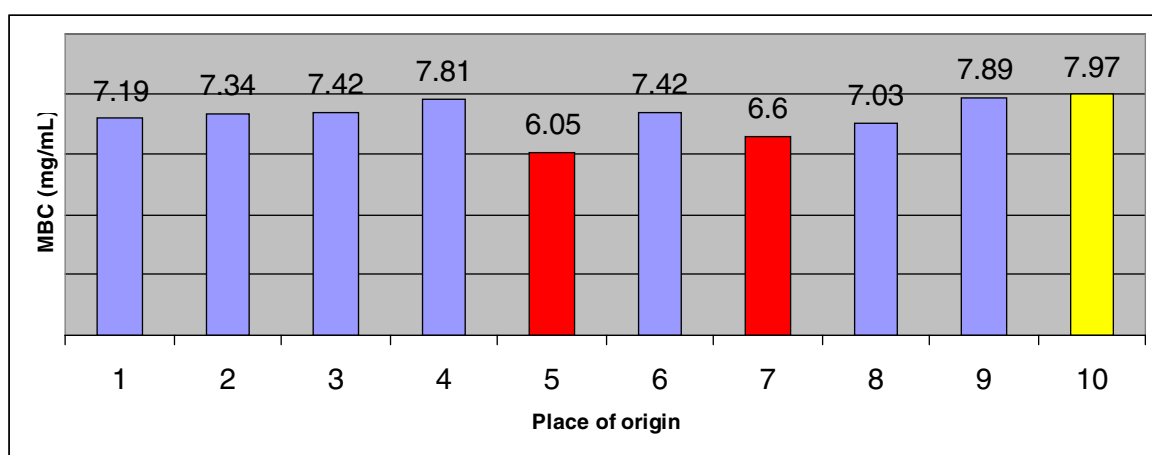


FIGURE 3. Average minimum concentration values of the propolis samples as distinguished in accordance with origin.



A partir de los resultados obtenidos se concluye que el color de los extractos de propóleos obtenidos de las diferentes zonas del Estado de Campeche incluidas en éste estudio varía del ámbar claro al café oscuro.

Los rendimientos en sólidos solubles totales son superiores al realizar la extracción en etanol al 80% que al emplear agua destilada.

Los metabolitos predominantes en ambos extractos son lactonas, saponinas, fenoles, triterpenos, esteroides, taninos, flavonoides, alcaloides y en menor grado grupos aminos, aunque en el caso de los extractos acuosos se detectó la presencia de leucoantocianidinas.

Tanto los extractos etanólicos como los acuosos presentan actividad antimicrobiana.

La actividad bactericida de los extractos depende del tipo de solvente empleado en la extracción, de la procedencia de los propóleos y del tipo de bacteria sobre la cual se aplican los extractos.

From the results obtained in this study, the colour of the propolis extracts, obtained from the different areas in the State of Campeche, ranged from amber to a dark brown like colour.

Yields in total soluble solids were higher when extraction processes were carried out in ethanol at 80% as opposed to distilled water.

The predominant metabolites in both extracts were lactones, saponines, phenols triterpenes, steroids, tannins, flavonoids, alkaloids and to a lesser extent amine groups. In the case of aqueous solution extracts, the presence of leucoantocianidins were also detected.

Both ethanol and aqueous solution extracts present antimicrobial activity.

The bactericidal activity of the extract solutions depend upon the type of solvent used in the extraction process, the origin of the propolis, and the type of bacteria to which the extracts are applied.

De las especies bacterianas evaluadas *S. typhi* es la bacteria más resistente y *P. aeruginosa* la más sensible. Dentro de los extractos de propóleos obtenidos de muestras colectas en diferentes zonas del estado de Campeche, los elaborados con propóleo de Hampolol presentaron la mayor efectividad antibacteriana, en tanto los de Pocyaxum fueron los que tuvieron la menor actividad.

With regard to bacterial resistance, *S. typhi* proved to be the most resistant while *P. aeruginosa* the most sensitive. Of the extracts distinguished in accordance with their origin within the state of Campeche, Hampolol propolis was found to be most effective in antibacterial activity while the Pocyaxum variety was found least effective.

BIBLIOGRAFÍA / BIBLIOGRAPHY

1. Grange, J.M.; Davey, R.W. 1990. Antibacterial properties of propolis. *J. of the Royal Society of Medicine*. 83(3):2-6.
2. Asís, M. 1989 Los productos de la colmena .- Centro de información y documentación, Agropecuario. Cap. 4. Vedado, La Habana, Cuba,, p 45 – 52.
3. Propravko, S. A. 1975. Composición química del propóleo, su origen y problemas de uniformación. Apimondia: Bucarest.. p. 19-22.
4. Walker, P.; Crane, E. 1987. Constituents of propolis *Apidologie* 18 (4) :327-334.
5. Akopyan, Z.M.; Shakaryan, G.A. and Danielyan, S.G. 1970. Sensitivity of microorganism to propolis in some districts of the Armenian S.S.R. *Biol. Zh. Armeniya*, 23(9): 70-74
6. Aranda, M.; González, Y.; Ortiz, L.; Serrano, E. 1995. Campeche, Historia y Geografía. 3er. Grado. Cap. 2. México, D.F.. p.20-47
7. Durand, E; Miranda, M; Cuéllar, A.C. 1986. Manual de prácticas del laboratorio de Farmacognosia. Editorial Pueblo y educación. La Habana, Cuba.p 157-164
8. Chiong., R.; Betancourt, A.; Cuza, C.; Concepción, M.; Álvarez, J.; Jiménez, D. 1985. Pruebas Microbiológicas para evaluar la efectividad bactericida de desinfectantes químicos. Sección de Microbiología Sanitaria, Laboratorio de desinfección y esterilización. Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología. La Habana, Cuba. p. 24-30.
9. Rojas, N.M. 1993. Actividad antimicrobiana del propóleos cubano. Tesis para optar por el título de Doctor en Ciencias, la Habana Cuba.
10. Martos, I.; Cossentini, M.; Ferreres, F.; Tomás-Barberán, F. 1997. Flavonoid Composition of Tunisian Honeys and Propolis. *J. Agric. Food Chem.* 45: 2824-2829.