

Interacción sinérgica de propóleo (Propolis) y orégano (*Lippia graveolens* Kunth s.l.) contra *Staphylococcus aureus*

Propolis and oregano (*Lippia graveolens* Kunth s.l.) synergic interaction against *Staphylococcus aureus*

Eduardo Lozano-Guzmán, Olga Dania López-Guzmán, Melissa Bocanegra-Salazar, Laura Cristina Davis-Figueroa, Lidia Beatriz de la Cruz Flores, Maribel Cervantes Flores

Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Juárez del Estado de Durango, México

Resumen

Staphylococcus aureus es un problema de salud, especialmente el resistente a meticilina (SARM). La investigación actual ha retomado los remedios herbolarios tradicionales para su combate, los cuales parecen tener buenas perspectivas. El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar los efectos inhibitorios de extractos etanólicos de orégano (*Lippia graveolens*) y extractos etanólicos de propóleo (*Propolis*) contra cepas SARM, por separado y en forma combinada. Se probaron dos tipos de extractos: al 20% y al 30% m/v de cada uno. Los ensayos de resistencia microbiana se hicieron por el método de macrodilución y las combinaciones se evaluaron mediante análisis isoblográfico. Los resultados muestran que todos los extractos tienen un fuerte poder inhibitorio, además, la combinación de ellos sugiere un efecto sinérgico.

Abstract

Staphylococcus aureus is a health public problem, especially resistant metical *S. aureus* (MRSA). Actually, research has resumed the traditional herbal treatments, which seems have a good perspectives. The aim of this work was to evaluate the inhibitory effects of oregano ethanolic extracts (*Lippia graveolens*) and ethanolic extracts of *Propolis* against MRSA strands by separate and combination way. Two kinds of extracts were obtained: 20% and 30% m/v of each one. Essays of microbial resistance were made by macro-dilution method and combinations were evaluated by isoglographic analysis. Results shows that all extract have strong inhibitory effects and further also suggest that combinations have a synergistic effect.

Palabras clave: Sinergismo, Análisis isoblográfico, SARM, Orégano, Propóleo.

Key words: Synergism, Isobolographic analysis, MRSA, Oregano, Propolis.

Correspondencia:

Dr. Eduardo Lozano Guzmán
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Juárez del Estado de Durango
Avenida Veterinaria S/N. Col. Valle del Sur. C.P. 34120
Tel y fax (618) 130 11 11 y (618) 130 11 20
e-mail: elozano@ujed.mx

Fecha de recepción: 19 de septiembre de 2013

Fecha de recepción de modificaciones:

25 de febrero de 2014

Fecha de aceptación: 5 de marzo de 2014

Introducción

Staphylococcus aureus es un microorganismo de gran importancia médica. Desde hace muchos años se le ha reconocido como uno de los principales agentes patógenos para el humano. *S. aureus* forma parte de la familia *Micrococcaceae*, género *Staphylococcus*, el cual contiene más de 30 especies diferentes y muchas de éstas son habitantes naturales de la piel y las membranas mucosas del hombre.^{1, 2} Es un patógeno versátil que en seres humanos puede causar diversas afecciones, entre las cuales se incluyen lesiones superficiales tales como abscesos de piel e infecciones de herida; infecciones sistémicas como bacteremia o síndromes toxémicos como la intoxicación alimentaria.³ Además de su participación en múltiples procesos infecciosos los estafilococos tienen gran importancia clínica por el incremento progresivo de mutaciones que les han conferido resistencia a múltiples antibióticos.^{4,5} A las cepas de *S. aureus* que presentan resistencia a los beta-lactámicos se les ha denominado *resistentes a meticilina*, o SARM.⁶ En México, la Red Hospitalaria de Vigilancia Epidemiológica (RHOVE), notificó que los porcentajes de mortalidad entre pacientes infectados con *S. aureus* variaron entre un 5% a un 70% en los últimos años, y que los porcentajes de mortalidad llegaron hasta un 50%.² Otro estudio llevado a cabo en seis centros hospitalarios del país reportaban una incidencia de SARM del 10% en las 17,000 cepas que fueron aisladas.⁷ La gran mayoría de los SARM no solo son resistentes a los β -lactámicos, sino también a múltiples antibióticos como vancomicina, oxacilina, la eritromicina, rifamicina y ciprofloxacino.^{2,8}

En la actualidad, junto con el desarrollo de nuevos antibióticos, se ha estado retomando la herbolaria tradicional como alternativa de combate. Una opción promisoriosa para combatir cepas resistentes, especialmente SARM, puede ser el uso de propóleo y orégano, como lo reportan varios trabajos.^{9, 10, 11, 12, 13, 14} Se ha definido al propóleo como una combinación de diversas sustancias que contiene bálsamos, aceites etéreos, polen, vitaminas, entre otros, y que confieren propiedades antifúngicas, antibacterianas y antiinflamatorias, elaborados por abejas (*Apis mellifera*) para protección de la colmena.^{15, 16, 17} Aunque se ha reportado que los efectos antibióticos varían con la región y temporada de colecta del propóleo y con el solvente usado en la extracción, el propóleo es tenido ya en la actualidad como un antimicrobiano innegable, especialmente en contra de *S. aureus*, cuyos mecanismos de acción incluyen debilitamiento de la pared celular, inhibición de la síntesis proteica e inhibición en el proceso de replicación y expresión genética.^{18, 19} El orégano, por su parte, es un arbusto que crece en forma silvestre en 24 estados de la República Mexicana. Se recolecta en forma manual, en especial las hojas, y se usa principalmente en alimentos.^{20, 21}

Se sabe que el aceite esencial inhibe el crecimiento de hongos y parásitos y es un excelente bactericida contra estreptococos y estafilococos.²² Los aceites esenciales de orégano, especialmente carvacrol y timol, parecen poseer el mayor efecto antimicrobiano frente a determinadas bacterias Gram positivas y Gram negativas. Dicha acción se debe al efecto sobre los fosfolípidos de la capa externa de la membrana celular bacteriana que provoca cambios en la composición de los ácidos grasos, lo que afecta la integridad de la pared celular externa.²³

Aunque se han reportado combinaciones exitosas de propóleo con otros compuestos^{24, 25} o bien, orégano con otros compuestos,²⁶ al parecer no hay reportes de trabajos en relación a la combinación de extractos de propóleo y orégano en contra de cepas SARM. Dado que ambos son coincidentes en sus formas de acción (principalmente debilitamiento de la pared celular), es de esperarse que combinaciones de ambos pudieran potencializar el efecto inhibitorio. El objetivo del presente trabajo fue evaluar los efectos inhibitorios de extractos etanólicos de orégano (*Lippia graveolens* Kunth s.l.) y extractos etanólicos de propóleo (*Propolis*) contra cepas SARM, por separado y en forma combinada.

Materiales y métodos

Reactivos y soluciones.

Caldo Muller Hinton (CMH) Becton Dickinson BBCTM Lote 0340475, Agar Muller Hinton (AMH) BD Bioxon Lote 0006404 y discos de Oxacilina (Becton, Dickinson and Company, BDBBL Sensi-disc de 1 μ g Ref. 231319). Para los extractos de propóleo y orégano se usó etanol absoluto (99.304%) CTR scientific lote 03T14165 (CTR 01160). Como cepa de referencia se empleó *S. aureus* ATCC 29213 en base a las recomendaciones del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).²⁷

Formulación de los extractos.

Se colectó propóleo de la región apicultora canatleca (Canatlán, Dgo., Mex.); se limpió, en forma manual, de ceras, restos de vegetales u otros insectos. El orégano, por su parte, fue adquirido en el mercado de la localidad. La determinación taxonómica estuvo a cargo de la Dra. M. Socorro González Elizondo, Directora del Herbario CIIDIR del Instituto Politécnico Nacional – Dgo. Dado que los extractos comúnmente comercializados en la región están hechos con etanol a una concentración del 20%, se eligió preparar extractos etanólicos al 20 y 30%. Se pesaron 20 g de propóleo y de orégano, cada uno por separado, y se les adicionó 100 mL de etanol; se dejó reposar por espacio de 8 días con agitación ocasional, protegido de la luz con cubierta de papel aluminio a temperatura ambiente.

De esta manera se obtuvieron los dos extractos al 20% (Propóleo PPL20 y Orégano 20). De forma similar se preparó el extracto al 30% (PPL30 y Orégano 30), pesando 30 g de cada uno por separado. Al final del reposo los extractos se filtraron por papel filtro Whatman y se alicuataron en tubos cónicos *corning* de 50 mL. Los extractos se mantuvieron protegidos de la luz y en refrigeración (5 a 7 °C) hasta el momento del estudio.^{10, 11, 17, 19}

Recolección y caracterización de cepas.

Se colectaron aleatoriamente 25 cepas de *S. aureus* en voluntarios cuya edad varió de 1 mes de nacimiento hasta 59 años provenientes del Hospital Municipal del Niño y del Hospital General de Durango, Dgo., Méx., mismas que fueron caracterizadas como *S. aureus* por pruebas bioquímicas de acuerdo a lo establecido por Mc Faddin.²⁸ Con el fin de identificar las cepas SARM se usaron discos de oxacilina de acuerdo a los lineamientos establecidos por el CLSI. La cepa ATCC29213 se usó como control de calidad para dicha identificación. Las cepas SARM identificada se usaron luego en las pruebas y se mantuvieron a -20 °C en medio Skim milk hasta el momento de su estudio.

Preparación del inóculo.

Cada cepa fue descongelada a temperatura ambiente y luego cultivada en placa con AMH por estrías cruzadas en cuatro campos e incubada a 37 °C por 24 hrs. Luego se tomaron dos colonias y se suspendieron en 150 mL de CMH obteniéndose una población inicial de entre 1x10E5 a 1x10E6 unidades formadoras de colonia, (ufc), que constituyó el inóculo, de acuerdo a las recomendaciones del CLSI.²⁷ Adicionalmente se cultivó una alícuota de dicho inóculo en placa con el fin de contabilizar la población del mismo expresada como ufc x 10E6.

Esta población se tomó como base para calcular las concentraciones Efectivas 50 (CE50), tal como se describe más adelante.

Estudios de inhibición.

Los estudios se hicieron por triplicado por el método de macrodilución, según lo descrito por Taroco et al.²⁹ En base a ensayos previos se establecieron los siguientes rangos de trabajo: 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.56, y 0.78 mg/mL para PPL20 y Orégano 20. Asimismo se usó 75, 37.5, 18.75, 9.37, 4.68, 2.34, y 1.17 mg/mL para PPL30 y Orégano 30. Después de la correspondiente inoculación se dejó actuar los extractos por espacio de 20 minutos y luego se sembraron 10 µL de cada concentración (y de cada serie) en placas con AMH. Tanto las placas como los tubos se incubaron a 37 °C por 18-20 horas. Con el fin de descartar el posible efecto inhibitorio del etanol usado en los extractos, se cultivó cada cepa en presencia de etanol puro a las mismas diluciones usadas en los extractos.

CMI, CMB y CE50. Se tomó como Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) aquella concentración en la cual no se tuviera turbidez apreciable debida al crecimiento. Para determinar la CMI se midió la Absorbancia por espectrometría a una longitud de onda de 625 nm. Las placas se contabilizaron expresando la población como u.f.c x10E6 / mL. Se estableció como Concentración Mínima Bactericida (CMB) aquella concentración en la cual no hubiera crecimiento en placa. La Concentración efectiva 50 (CE50) se calculó de la siguiente manera: a) en cada caso se determinó la mortalidad como la diferencia entre la población inicial (inóculo) y la contabilizada en la placa a cada concentración de antibiótico. b) se determinó el porcentaje de efecto como la relación entre el promedio de la mortalidad de las tres corridas en cada concentración y la población inicial. c) Se graficó el log de las concentraciones vs % de efecto obteniéndose una recta. Se determinó la ecuación correspondiente. d) Finalmente, con dicha ecuación se calculó la concentración a la cual se obtendría el 50% de efecto (CE50).

Estadística y software: Para verificar diferencias intergrupales entre los extractos de propóleo y orégano se aplicó una ANOVA con una significancia estadística $\alpha \leq 0.05$. Se usó el programa Microsoft Excel y el paquete estadístico SPSS v. 19.0.

Combinaciones: Con el fin de evaluar las combinaciones entre los extractos de propóleo y orégano se siguió la metodología descrita por Talladira³⁰ para estudios isoblográficos. Se ha demostrado que este método es sencillo y objetivo para evaluar combinaciones de fármacos. La línea de aditividad se estableció en base a la CE50 promedio de las cepas estudiadas. La tabla 1 muestra la serie de combinaciones establecidas para dichas combinaciones.

Tabla 1.- Combinaciones de extractos de PPL y Orégano*

Num de comb.	PPL 20 + Orégano 20	Num de comb.	PPL 30 + Orégano 30
1)	8.6 + 0	6)	4.78 + 0
2)	4.3 + 0.6	7)	2.39 + 0.4
3)	2.15 + 0.3	8)	1.19 + 0.2
4)	1.07 + 0.15	9)	0.59 + 0.1
5)	0 + 1.2	10)	0 + 0.8

*Concentraciones en mg/mL

Resultados y discusión

Los resultados muestran una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre los efectos inhibitorios de los diversos extractos aplicados de forma individual, siendo el más efectivo el propóleo al 30%, (Tabla 2).

La cepa ATCC 29213 mostró alta sensibilidad para todos los extractos ensayados. En cuanto a las combinaciones, se obtuvo un efecto inhibitorio del 92.9 % en promedio para las cepas tratadas con la combinación 2. Como puede observarse en la Figura 1, hay crecimiento en extracto de Orégano 20 a concentración 12.5 mg/mL (A3), de igual forma se presenta crecimiento en extracto de PPL20 a 1.56 mg/mL (B6). Sin embargo, en la combinación 2, (4.3+0.6 mg/ml de Orégano 20 + PPL20 respectivamente) no hay crecimiento apreciable (C1). Esto es: la combinación de ambos extractos, aunque menor en concentración, resulta más potente que la administración en forma individual de cada extracto, por lo que se pudiera inferir un comportamiento sinérgico. De forma similar se observó un efecto inhibitorio del 100% por la combinación 7. En ambos casos las CE50 teóricas y experimentales se compararon en el isoblograma correspondiente (Figura 2). El punto A muestra la primera combinación teórica (combinación 2). Sin embargo, después hacer los estudios de inhibición *in vitro*, la combinación experimental promedio para las cepas estudiadas resultó de 3.05 Orégano 20 + 0.29 PPL20 mg/mL como lo muestra el punto B.

Tabla 2.- Concentraciones mínima inhibitoria, bactericida y efectiva 50 (CMI, CMB y CE50 respectivamente) para los diversos extractos aplicados en forma individual.*

	Orégano		PPL	
	20%	30%	20%	30%
CMI	12 ± 3	11,1 ± 3	9,33 ± 3,16	7,1 ± 5,86
CMB	22,67 ± 6,5	21,17 ± 6,5	18,67 ± 6,32	13,8 ± 3,72
CE50	8,6 ± 3,48	4,78 ± 1,26	1,2 ± 0,49	0,8 ± 0,31

*Concentraciones en mg/mL ± desv. est.

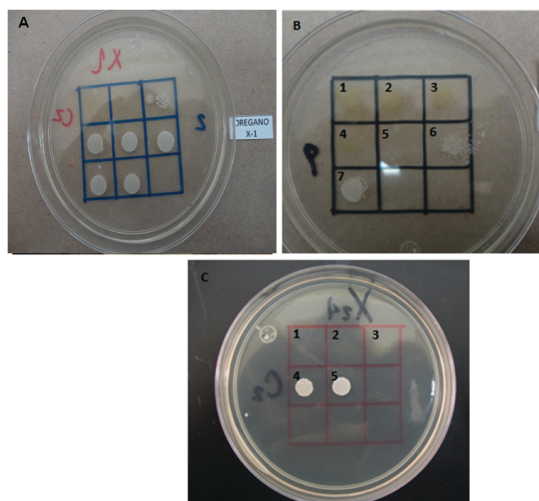


Figura 1.- En el panel A se muestran las diluciones del extracto de orégano 20 solo y en el panel B las correspondientes para PPL20 solo, ambas en mg/mL: 1) 50, 2) 25, 3) 12.5, 4) 6.25, 5) 3.125, 6) 1.56 y 7) 0.78. En el panel C se muestran las combinaciones 1 a 5 tal como aparecen en la tabla 1.

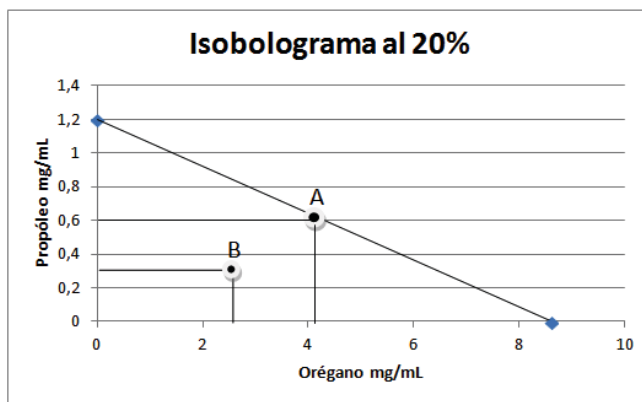


Figura 2.- Isoblograma de las combinaciones oregano20 y PPL20. La línea de aditividad une las CE50 1.2 mg/mL de PPL20 y 8.6 mg/mL de orégano 20.

Adicionalmente fueron evaluadas por “t” de Student la concentraciones de las combinaciones teóricas y experimentales de las cepas estudiadas tal como lo establece la metodología descrita por Talladira,³⁰ siendo significativamente diferentes ($p < 0.05$) para todas las cepas estudiadas. Finalmente, para ambos casos (combinación 2 y 7), el índice de interacción γ fue menor a 1, indicativo de un efecto sinérgico.

La sensibilidad mostrada por la cepa de referencia ATCC 29213 usada en nuestro estudio parece tener concordancia con trabajos similares: por ejemplo Lessio et al¹⁹ reporta concentraciones 25 a 50 $\mu\text{g/mL}$ en extractos de propóleo contra cepa *S. aureus* ATCC 25923. También Tolosa y Cañizares¹⁴ reportan CMI de entre 0.93 a 3.75 mg/mL, para extractos etanólicos y de 3.75 a 7.5 mg/mL para extractos acuosos contra la misma cepa ATCC 25923. En todos los casos las cepas de referencia se muestran altamente sensibles a los extractos. Sin embargo, las CMI determinadas para las cepas SARM (9.3 mg/mL para PPL20 y 14.1 \pm 7.1 mg/mL para PPL30) parecen estar por debajo de las reportadas en otros trabajos, por ejemplo, Díaz et al⁹ reporta CMI de 51 a 79 mg/mL contra la cepa de referencia *S. aureus* ATCC 25923. Esta diferencia quizá pueda explicarse por la variabilidad de concentraciones de los diversos compuestos a los que se les ha atribuido el poder antimicrobiano del propóleo, ya sea por el tiempo y lugar de recolección o bien, por el método de extracción usado.¹⁴

Por otro lado, en cuanto a los efectos sinérgicos de las combinaciones, Al-Waili et al³¹ en 2012 reporta una disminución al 30% de la CMI determinada para cepas estudiadas en la combinación de extractos etanólicos de propóleo y miel de abeja sobre *S. aureus*. Dado que sólo muestra los resultados en porcentaje es difícil tener un punto de comparación más preciso, sin embargo, es innegable que la combinación de propóleo con otras sustancias naturales puede

traer efectos sinérgicos. No se encontraron más reportes que evalúen el efecto combinado de propóleo y orégano sobre *S. aureus* o cualquier otro microorganismo.

Finalmente, es necesario señalar que nuestros resultados presentan una desviación estándar considerable y que aunque los extractos PPL30 son, estadísticamente, los más efectivos (Tabla 2), si se tienen en cuenta estas fluctuaciones se pudiera concluir que entre ambos extractos no hay diferencia. La variabilidad en desviación estándar puede atribuirse a que las cepas son heterogéneas ya que fueron recolectadas de la comunidad y pudieran representar la variabilidad del comportamiento de SARM presente entre la población. Asimismo, aunque la efectividad de nuestras combinaciones se pudiera atribuir a la acción combinada de los extractos que otros autores han reportado tales como debilitamiento de la pared celular e inhibición de los mecanismos genéticos de replicación,^{24,25,26} definitivamente se debe enfocar en un futuro la investigación para determinar los mecanismos exactos de acción.

Conclusiones

Tanto los extractos etanólicos de propóleo como de orégano son una buena alternativa para combatir cepas de *S. aureus* incluyendo el resistente a meticilina, pero, basados en nuestros resultados, la combinación de ambos resulta ser aun más efectiva.

Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo y financiamiento de la Facultad de Ciencias Químicas – Dgo, de la Universidad Juárez del Estado de Durango.

Referencias

1. Bustos M, Hamdan P, Gutierrez C. *Staphylococcus aureus*: la reemergencia de un patógeno en la comunidad. Rev Biomed. 2006; 17(4): 287-305.
2. Velásquez- Meza M E. *Staphylococcus aureus* Meticilina Resistentes. Salud Pública de Mex. 2005; 47:381-387.
3. Espinoza I, Gómez F. Evaluación de la efectividad del aceite esencial de orégano sobre microorganismos y su aplicación en producto cárnico. [Tesis de grado]. Instituto Tecnológico de Durango. 2007; pp. 2-13.
4. Jarraud S, Mougél C, Thioulouse J, Lina G, Meugnier H, Forey F, Nesme X, Etienne J, Vandenesch F. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, agr groups (alleles), and human disease. infect immun. 2002; 70:631-641.
5. Gil DM. *Staphylococcus aureus*: Microbiología y aspectos moleculares de la resistencia a meticilina. Rev Chil Infect. 2000; 17(2):145-52.
6. Hernández V, Toraño P, González M, González B. *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina: detección de portadores entre niños hospitalizados y niños sanos de la comunidad. Rev Cub Med Tro. 2003; 55(3):153-161.
7. Sifuentes OJ, Donis HJ, Arredondo GJ, Escalante RO, Macias A, Muñoz JM, Ontiveros L, Tinoco JC. Informe sobre resistencia bacteriana: estudio piloto en seis centros de México. Rev Panam Infect. 2000; S45-S47.
8. Filimon MN, Borozan AB, Gotia SL, Popescu R, Gherman VD. Testing the sensitivity of *Staphylococcus aureus* antibiotics. Anale Universitaji din Oradea, Fascicula Biologie. 2009; 16(2):70-3.
9. Díaz M, Gil R, Valdez G. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria de propóleos cubanos a partir de dos técnicas diferentes. Apiciencia, 2010; 2(2):1-12.
10. Farré R, Frasset I, Sánchez A. El propolis y la salud. Ars Pharm. 2004; 45(1):21-43.
11. Manrique AJ, Weyder CS. Flavonoides, actividades antibacteriana y antioxidante de propóleos de abejas sin aguijón, *Melipona quadrfasciata*, *Melipona compressipes*, *Tetragonisca angustula* y *Nannotrigona* sp. de Brasil y Venezuela. Zootecnia Trop. 2008; 26(2):157-66.
12. Mayta T, Sacsquispe C. Evaluación in vitro del efecto antibacteriano del extracto etanólico de propóleo de Axapampa - Perú sobre cultivos de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Rev Estomatol Herediana. 2010; 20(1):19-24.
13. Palomino LR, Martínez JP, García CM, Gil JH, Durango DL. Caracterización fisicoquímica y actividad antimicrobiana del propóleo en el municipio de La Unión (Antioquia, Colombia). Rev Fac Nal Agr Medellín, 2010; 63(1):5373-83.
14. Tolosa L, Cañizares E. Obtención, caracterización y evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos de Campeche. Ars Pharm. 2002; 43: 187-204.
15. Bracho JL, Rodríguez C, Llanes F. Triterpenos pentacíclicos en propóleo. Rev Soc Quim Perú. 2009; 75(4): 439-52.
16. Marcen JJ. Antimicrobianos naturales. Med Nat, 2002:104-108.
17. Boyanova L, Derejian S, Koumanova R, Katsarov N, Gergova G, Mitov I, Nikolov R, Krastev Z. Inhibition of *Helicobacter pylori* growth in vitro by Bulgarian propolis: preliminary report. J Med Microbiol. 2003; 52: 417-419.
18. Palomino L. R., Martínez J. P., García C. M., Gil J. H., Durango D. L. 2009. Determinación del contenido de fenoles y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos recolectados en el departamento de Antioquia, (Colombia). *Vitae*, 16:388-395.

19. Lessio M, Riveiro W, Zauli R, Ikegaky M, Garcia M, Floggio M, Rosalen P. Bioassay guided purification of the antimicrobial fraction of a Brazilian propolis from Bahia state. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 2009; 9:25.
20. Huerta C. Orégano mexicano, oro vegetal. *Biodiversitas*. 1997; 15:8-13.
21. De La Cruz M, Gastelum M, Silva R, Nevárez G. Efecto microbiano del orégano mexicano y su aceite esencial sobre cinco especies del género *Vibrio*. *Rev Fitotec Mex*. 2007; 30(3): 261-267.
22. Villavicencio G. Orégano, recurso con alto potencial. *Rev Cienc Des*. 2007; 33 (211): 60-66.
23. Núñez M. Evaluación preliminar de las poblaciones bacterianas asociadas al tracto intestinal de la tilapia (*Oreochromis niloticus*) expuesta a aceites esenciales de orégano en la dieta. [Tesis de grado]. Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. 2011: pp. 33-35.
24. Lozina L, Ojeda M, Ramírez G, Acosta De Pérez O. Actividad y sinergismo de propóleos y antibióticos sobre bacterias aisladas de otitis canina: estudios preliminares. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas*. Universidad Nacional del Nordeste, Ar. 2008: 1.
25. Fernandes A, Balestrin E, Betoni JE, de Oliveira R, Ribeiro ML, Montelli A. Propolis: *anti-Staphylococcus aureus* activity and synergism with antimicrobial drugs. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2005; 100(5): 563-566.
26. Chávez L, Castañeda F, Rosadio G, Estrada E. Efecto sinérgico del aceite esencial de *Origanum vulgare* y Gentamicina en cultivos de *Escherichia coli*. *CIMEL*; 200813(2): 1-12.
27. Clinical and Laboratory Standards Institute, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement. 2010; 30(1): 60-73.
28. Mc Faddin. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3a Ed. Editorial Médica Panamericana, 2003.
29. Taroco R, Seija R, Vignoli R. Métodos de estudio de la sensibilidad antibiótica. *Temas de bacteriología y virología médica*. 2010. <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/BacteCEFA36.pdf>. Acceso 2 Ago 2013.
30. Talladira RJ. Drug Synergism: its detection and applications. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001; 298(3):865-872.
31. Al-Waili N, Ghamdi A, Ansari M, Al-Attal Y, Salom K. Synergistic effects of honey and propolis toward drug multi-resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans* isolates in single and polymicrobial cultures. *Int J Med Sci*. 2012; 9(9): 793- 800.