



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

“ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA *in vitro* DE PROPÓLEOS MEXICANOS CONTRA
CEPAS DE *Pasteurella multocida* DE ORIGEN PORCINO”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA:

BERENICE XOCHIQUETZAL PÉREZ TORRES

TUTOR PRINCIPAL:

DR. TONATIÚH ALEJANDRO CRUZ SÁNCHEZ
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

COMITÉ TUTOR:

DRA. MARÍA MARGARITA CANALES MARTÍNEZ
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

DR. FRANCISCO AGUILAR ROMERO
INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES FORESTALES, AGRÍCOLAS Y PECUARIAS

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO

OCTUBRE 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Realizado bajo el apoyo de:

- Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT): IT223811-3 “Perspectivas del uso de propóleos en la salud animal”.

- Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT): IT200915 - *Desarrollo de productos con propóleo para su uso en la pasteurelisis del conejo, el Distemper canino y la otitis canina*

Se realizó en los laboratorios:

- Laboratorio 6 de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 4, UNAM, bajo la responsabilidad del Dr. Tonatiuh A. Cruz Sánchez.
- Laboratorio de Farmacognosia de la Unidad de Biotecnología y Prototipos de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. Bajo la responsabilidad de la Dra. María Margarita Canales Martínez.
- Laboratorio de Microscopía Electrónica de Transmisión, Instituto de Ciencias Biomédicas, UNAM. Responsable: Dr. Horacio Merchant Larios.
- Laboratorio de Microbiología Veterinaria, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Universidad Nacional Autónoma de México. Responsable: M. V. Z. Marco Antonio Mendoza Saavedra.

Con el apoyo de CONACYT, favorecida con la beca número: 513677

Agradecimientos

A Dios, por darme la oportunidad de conocer más de tu grandeza, por medio de esto a lo que llamamos ciencia. Gracias por ponerme en este camino y por las personas que he conocido a través de él.

A mis padres: Rosa María y Alejandro, a mis hermanos Adriana y Tonatiúh, por su cariño y apoyo incondicional a pesar de las torpezas que a veces cometo. Gracias por sus palabras de aliento y superación, por darme el ejemplo de responsabilidad y amor en la familia. Gracias por enseñarme a ser mejor persona cada día.

A mi hija Aiko Leilani, por ser el motor y la inyección de energía que me impulsa todos los días. Porque aprendes con el ejemplo, quiero enseñarte que se puede ser mejor cada día, a trabajar en equipo, siempre con amor y esfuerzo. Este logro es para ti y por ti.

A mis maestros: Dr. Tonatiúh Cruz, Dra. Margarita Canales y Dr. Francisco Romero por compartir sus conocimientos y su valioso tiempo para poder concluir este proyecto.

A mis amigas Elisa y Betsabé por escucharme, ayudarme, regañarme cuando hace falta y por aconsejarme. Gracias por compartir sus experiencias y sobre todo, gracias por la oportunidad de conocerlas y permitir que las acompañe en este camino.

A todas aquellas personas, que aunque parecía poco el apoyo que me brindaron, contribuyeron de gran manera a que este trabajo finalmente pudiera llegar a su culminación. Aunque parecen estar lejos, siempre se preocupan por mí.

Índice

Índice de figuras	6
Índice de tablas	7
Resumen	8
Abstract	9
Introducción	10
Naturaleza del propóleo	10
El propóleo a lo largo de la historia	10
Composición química	11
Pinocembrina, uno de los compuestos responsables de la acción del propóleo	12
Situación actual de la Porcicultura en México	15
Pasteurellosis porcina	17
Agente etiológico	17
<i>Pasteurella multocida</i> como parte del Complejo Respiratorio Porcino	18
Lesiones	19
Diagnóstico	21
Tratamiento	22
Prevención	22
Propóleo en Medicina Veterinaria	24
Justificación	26
Hipótesis	27
Objetivos	28
Diseño experimental	29
Material y Métodos	30
Resultados	48
Análisis estadístico	53
Discusión	62
Conclusiones	66
Perspectivas	67
Anexos	68
Bibliografía	78

Índice de figuras

Figura 1.	Estructura química de la pinocembrina	12
Figura 2.	Micrografía electrónica de transmisión de <i>Bacillus cereus</i> sin tratamiento y con tratamiento de propóleo	13
Figura 3.	Micrografía de microscopia electronica de transmisión de <i>Cryptococcus neoformans</i> con tratamiento de propóleo	14
Figura 4.	Consumo de carne de cerdo por año en México	15
Figura 5.	Principales estados productores de carne de cerdo en México.	16
Figura 6.	Cerdo en posición de "sentado"	18
Figura 7.	Pulmón con lesiones consolidadas	19
Figura 8.	Pulmón consolidado por lesiones neumónicas	20
Figura 9.	Pulmones con diferente grado de pleuritis y fibrina.	20
Figura 10	Crecimiento de colonias de <i>Pasteurella sp.</i> en agar sangre.	21
Figura 11	Mapa de la República Mexicana	30
Figura 12	Propóleo en greña y Extracto Etanólico del municipio de Cuautitlán Izcalli	31
Figura 13	Propóleo en greña y Extracto Etanólico del municipio de Villa del Carbón	32
Figura 14	Propóleo en greña y Extracto Etanólico del municipio de Tlapujahua	33
Figura 15	Propóleo en greña y Extracto Etanólico del municipio de San José Iturbide	34
Figura 16	Propóleo en greña y Extracto Etanólico del municipio de Tianguismanalco	35
Figura 17	Proceso de filtración y recuperación de etanol en rotavapor	36
Figura 18	Pulmones consolidados	38
Figura 19	Pulmones con lesiones neumónicas	38
Figura 20	Pulmones con lesiones neumónicas	39
Figura 21	Agar sangre con crecimiento de colonias de <i>P. multocida</i>	40
Figura 22	Pruebas primarias de identificación bacteriana	41
Figura 23	Prueba de Ácido Sifídrico, Indol y motilidad (SIM) y prueba de Acriflavina	41
Figura 24	Prueba de antibiograma	45
Figura 25	Gráfica comparativa entre Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Bactericida Mínima	51
Figura 26	Análisis estadístico de la Concentración Mínima Inhibitoria	53
Figura 27	Análisis estadístico de la Concentración Bactericida Mínima	53
Figura 28	Curva de crecimiento de <i>P. multocida</i>	55
Figura 29	Agar Müeller Hinton con 24 horas de incubación	56
Figura 30	Micrografía electronica de transimisión de <i>P. multocida</i> sin tratamiento de propóleo.	58

Figura 31	Micrografía electronica de transimisión de <i>P. multocida</i> sin tratamiento de propóleo.	59
Figura 32	Micrografía electronica de transimisión de <i>P. multocida</i> con tratamiento de propóleo.	60
Figura 33	Micrografía electronica de transimisión de <i>P. multocida</i> con tratamiento de propóleo.	61
Figura 34	Esquema de un cromatógrafo de líquidos	68
Figura 35	Cromatograma de una mezcla "x"	69
Figura 36	Cromatograma del propóleo de Cuautitlán Izcalli	70
Figura 37	Cromatograma del propóleo de Villa del Carbón	70
Figura 38	Cromatograma del propóleo de Tlalpujahua	71
Figura 39	Cromatograma del propóleo de San José Iturbide	71
Figura 40	Cromatograma del propóleo de Tianguismanalco	72
Figura 41	Microscopía electrónica de barrido y de transmisión de <i>E. coli</i>	73
Figura 42	Componentes de un microscopio óptico y microscopio electrónico de transmisión y difracción.	74
Figura 43	Placa de Elisa	76

Índice de tablas

Tabla 1	Aplicaciones del propóleo en Medicina Veterinaria	24
Tabla 2	Rendimiento de los propóleos	49
Tabla 3	Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Bactericida Mínima de los aislamientos de <i>P. multocida</i>	50
Tabla 4	Resultados de la prueba de antibiograma de los aislamientos de <i>P.</i>	52
Tabla 5	Compuestos químicos hallados en los EEP	54
Tabla 6	Resultados del análisis de la Cromatografía Líquida de Alta Eficacia	54

RESUMEN

El propóleo es una sustancia resinosa, gomosa, de consistencia viscosa, elaborada por *Apis mellifera*, que presenta propiedades como antimicrobiano, antiviral, inmuno estimulante, antiparasitario, antioxidante, entre otras. Su actividad biológica depende principalmente de su origen botánico. En Medicina Veterinaria se han realizado estudios en diversos animales utilizando propóleo; en el caso del cerdo se ha implementado como antimicrobiano y cicatrizante en lesiones de quemaduras en piel y como inmuno modulador.

El presente trabajo tiene como objeto evaluar el efecto antimicrobiano de distintos extractos etanólicos de propóleo (EEP) de diferentes municipios de la República Mexicana (Cuautitlán Izcalli y Villa del Carbón en el Estado de México, Tlalpujahua en Michoacán, San José Iturbide, Guanajuato y Tianguismanalco, Puebla) frente a cepas de *Pasteurella multocida*, uno de los principales agentes causantes de neumonías en cerdos en etapas de crecimiento y finalización. La prueba de sensibilidad al propóleo se realizó mediante la técnica de micro dilución en caldo.

Se encontró un rango de Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) desde 0.046 mg/mL hasta 0.18 mg/mL y un rango de Concentración Bactericida Mínima (CBM) desde 0.18 mg/mL hasta 1.5 mg/mL para el propóleo de FESC; que fue el que presentó una mejor actividad frente a las cepas 1, 2, 4 y 5. La cepa 3 fue la menos sensible a los extractos.

Mediante la Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC) se encontraron flavonoides (naringenina, pinocebrina, crisina y catequina) que sugieren la actividad biológica antimicrobiana de los extractos etanólicos analizados.

Complemento de este, también se realizó la Microscopía Electrónica de Transmisión sobre una muestra tratada con EEP. En esta se observó que tras la interacción con EEP con la bacteria hay vacuolización dentro de las células, además de alteración y ruptura de las estructuras de la cubierta externa de la bacteria con liberación de material intracelular. Hecho no reportado para esta bacteria.

Palabras clave: Propóleo, *Pasteurella multocida*, neumonías de cerdo.

ABSTRACT

Propolis is a waxy, gummy, sticky substance, produced by *Apis mellifera* with antimicrobial, antiviral, immunostimulating, antiparasite and antioxidant qualities, among others. It's biological activity depends mainly on it's botanic origin.

Propolis has been used in plenty of research with different animals; in the case of swine, it has been used as a skin regenerator in case of burns and as immunomodulator.

The aim of this paper is to evaluate the antimicrobial effect of different propolis ethanolic extracts of several regions of Mexico (Cuautitlán Izcalli, Villa del Carbón, Tlalpujahua, San José Iturbide and Tianguismanalco) in contact with *Pasteurella multocida* since this bacteria is one of the main agents of swine pneumonia in growth and final stages.

The sensibility test to propolis was made through the microdilution in broth technique.

A Minimal Inhibition concentration (MIC) was found from 0.046 mg/mL to 0.18 mg/mL and Minimal Bactericide Concentration (MBC) from 0.18 mg/mL to 1.5 mg/mL for the Cuautitlán Izcalli simple, which showed the best activity with 1, 2, 4 and 5 strains. Strain 3 as the least sensitive to the extracts.

The use of High Performance Liquid Chromatography (HPLC) showed naringenine, pinocembrine, crisin and catechine flavonoids, which are an evidence of antimicrobial biological activity of the tested propolis.

One more process developed was the Electronic Microscopy of Transmission used in a sample treated with Cuautitlan Izcalli propolis. This showed that the presence of propolis contributes to the creation of vacuoles within the bacterial cell, alongside alteration and break up of the structures of the cell Wall with release of intracellular material, which has not been reported as a formal fact for this bacteria.

Key words: Propolis, *Pasteurella multocida*, swine pneumonia, flavonoids.

INTRODUCCIÓN

Naturaleza del propóleo

El propóleo es una sustancia balsámica de aspecto resinoso, que recolectan las abejas (*Apis mellifera*) a partir del exudado de plantas y árboles. ⁽¹⁻²⁾

Las abejas lo utilizan en su colmena para cerrar grietas, mantener la temperatura, o embalsamar animales invasores que mueren dentro del panal. ⁽³⁻⁴⁾ La palabra propóleo, proviene del griego pro (antes) y polis (ciudad), esto se traduce como "defensor de la ciudad". ⁽⁵⁻⁶⁾

Durante el proceso de recolección, las abejas encargadas de recolectar el propóleo (llamadas pecoreadoras), desprenden la resina de la fuente vegetal con sus mandíbulas, adicionando secreciones de sus glándulas salivales. Maniobran con sus patas hasta colocarla en los cestillos de sus extremidades posteriores. ^(1,5)

El propóleo es recolectado durante las horas más cálidas del día (entre las diez de la mañana y las tres de la tarde), ya que las abejas aprovechan las altas temperaturas para facilitar la recolección. A temperaturas bajas la resina tiende a ser muy dura y friable, y difícil de recolectar pero a temperaturas de más de veinte grados, se vuelve muy maleable. ⁽¹⁾

El propóleo a lo largo de la Historia

El propóleo ha sido utilizado desde tiempos antiguos. Los egipcios ya conocían de su efecto para evitar la putrefacción, por lo que lo utilizaban para embalsamar a sus cadáveres. ⁽⁷⁾

En Grecia y Roma, lo emplearon como antiséptico y cicatrizante para tratar heridas en piel, además de utilizarlo como desinfectante para la boca. En América, la cultura Inca lo empleaba como agente antipirético. ⁽⁸⁻⁹⁾

Entre el siglo XVII y XX se volvió muy popular debido a su actividad antibacteriana. Además, le fueron reconocidas propiedades anti fúngicas, antivirales, hepatoprotectoras y anti inflamatorias. ^(5, 8)

Hoy en día, existe una gran diversidad en productos que contienen propóleo. Se puede encontrar en cápsulas, extractos, preparaciones para enjuagues bucales, pomadas, e incluso en cosméticos.

Composición química

Al propóleo recolectado directamente de la colmena, se le llama propóleo en greña, o en bruto, éste se compone de un 50% de resina, (en esta porción, encontramos la fracción polifenólica, que es la que contiene a los flavonoides y los ácidos fenólicos), 30% de cera, 10% de aceites esenciales, 5% de polen y un 5% de otros componentes orgánicos. ^(5, 10)

La composición de cada propóleo dependerá principalmente de la vegetación de la zona, ubicación geográfica de la colmena, clima, época del año en que se recolecte, entre otros factores. ⁽¹¹⁾

Cada planta o árbol del que recolectan las abejas, aporta compuestos diferentes al propóleo. Estas resinas, contienen metabolitos secundarios, que son los responsables de las distintas propiedades que se le atribuyen a este producto de la colmena. Se han encontrado más de 180 compuestos biológicamente activos en los propóleos, entre ellos: polifenoles, (en su mayoría flavonoides), acompañados de ácidos fenólicos y sus ésteres, aldehídos fenólicos, cetonas, etc. ⁽¹²⁻¹⁴⁾

Un estudio en el cual se evaluó la composición de un extracto del estado de México, reporta los siguientes flavonoides: isoflavona, flavonas, quercetina, 6 derivados de ácido cinámico y 1 derivado del ácido caféico. ^(5, 7)

Pinocembrina, uno de los compuestos responsables de la acción del propóleo

La pinocembrina, es uno de los principales flavonoides encontrados en los Extractos Etanólicos de diferentes Propóleos. Su estructura química se muestra en la figura 1. ⁽¹¹⁾

Su mecanismo de acción antibacteriana, se ha estudiado en bacterias como *Neisseria gonorrhoeae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus lentus*, y *Klebsiella pneumoniae*, en donde se observaron cambios en la composición de la membrana, además de la inducción de lisis celular. ⁽¹³⁾

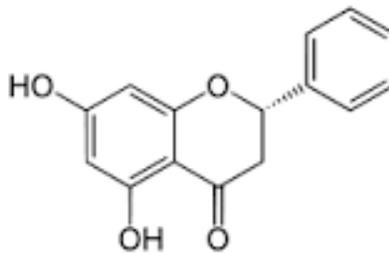


Fig. 1 Estructura química de la pinocembrina ⁽¹³⁾

Fierro en el 2000, menciona como mecanismo de acción antimicrobiana la alteración en el flujo de energía en la membrana citoplasmática, así como inhibir la motilidad, haciendo a las bacterias más vulnerables al ataque del sistema inmunológico. ⁽¹⁵⁾

Havsteen (2002) menciona que el efecto antibacteriano de los flavonoides podría influir en la unión de estos compuestos con metaloenzimas de las bacterias y esta interacción podría causar daños en la integridad de la membrana. ⁽¹⁶⁾

Algunos flavonoides, pueden tener actividad sobre la pared celular, formando complejos protéicos extracelulares y proteínas solubles, que alteran la integridad de esta estructura, evitando su correcto funcionamiento y provocando la muerte de la bacteria. ⁽¹¹⁾

Takaisi en 1994 estudió el efecto del propóleo sobre bacterias Gram positivas y concluye que su efecto se da al desorganizar el citoplasma y la pared celular, causando una bacteriólisis parcial y la inhibición de la síntesis proteica. ⁽²⁾

En un estudio, Youn y Hyun en 2011 evaluaron el efecto de propóleo coreano sobre *Bacillus cereus*. Se reporta, que el daño sobre el bacilo se observó directamente sobre la pared celular, probablemente por la alteración en el flujo energético de la membrana, causando daño irreversible sobre estas estructuras. En la figura 2, se observa una aparente filtración de contenido intracelular de la bacteria. ⁽⁵⁾

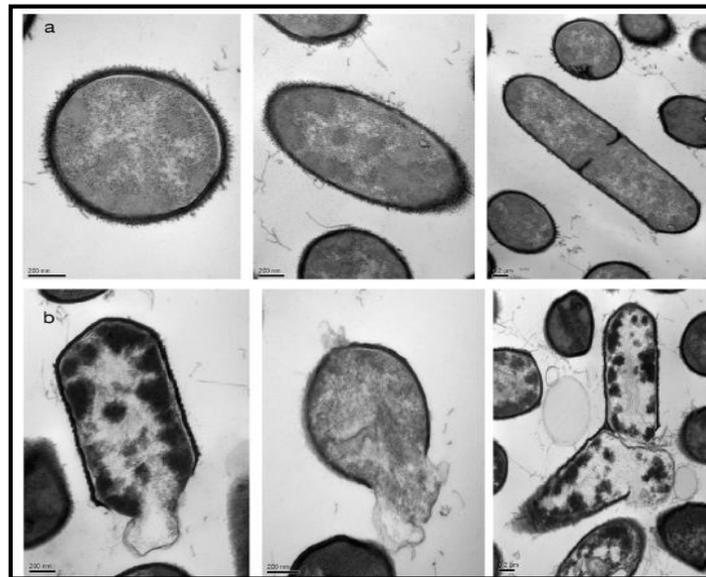


Fig. 2 Micrografía de *Bacillus cereus* sin tratamiento y con tratamiento de propóleo. (Magnificación, 57,000). a) Bacteria sin tratamiento. b) Bacterias tratadas. ⁽⁵⁾

Por medio de Microscopía Electrónica de Transmisión (MET), se evaluó el efecto un EEP, en el cual se demuestra daño celular en hongos levaduriformes (Fig. 3). Es posible que pueda actuar de manera similar en las bacterias, ya que se observó deformación de las levaduras y la alteración y ruptura de la pared celular después de ser sometidas al tratamiento. ⁽¹⁷⁾

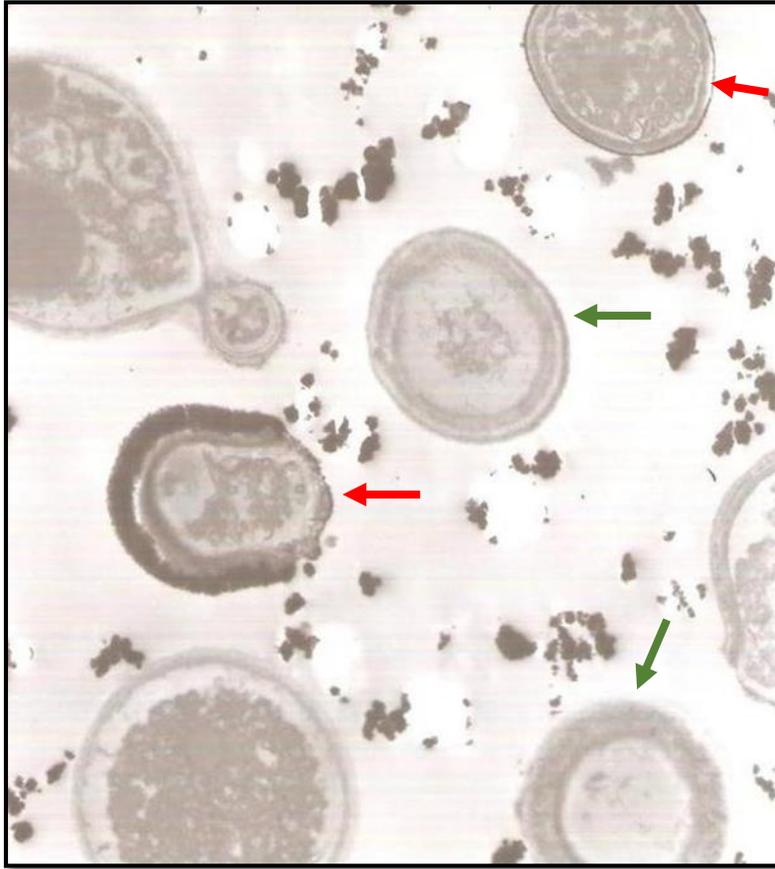


Fig. 3 Micrografía de microscopía electrónica de transmisión de *Cryptococcus neoformans* incubado 24 hrs. con EEP (7000x). Se observan células fúngicas degeneradas que se señalan con flecha roja y células normales señaladas con flecha verde. ⁽¹⁷⁾

Situación actual de la Porcicultura en México

Dadas las propiedades nutricionales que hoy en día se encuentran en la carne de cerdo, es considerada como carne magra. Muchos cortes magros tienen niveles similares de grasa a una pechuga de pollo sin piel. ⁽¹⁸⁾ Actualmente los productores se han preocupado por hacer más eficientes la alimentación y la crianza de los animales para que la carne que llega al consumidor, sea cada vez más inocua.

En México, la producción de carne de cerdo hasta junio de 2016 ha generado 114 950 toneladas, lo que genera empleos directa como indirectamente. De las toneladas que se producen, se exportan aproximadamente 17 mil toneladas al año, y se importan 83 mil. ⁽⁹⁾

El consumo nacional se ha garantizado mediante el mejoramiento en técnicas de producción y mejoramiento genético de última generación.

El consumo per-cápita de carne de cerdo se ha incrementado en los últimos años, tal como se observa en la figura 4. ⁽¹⁸⁾

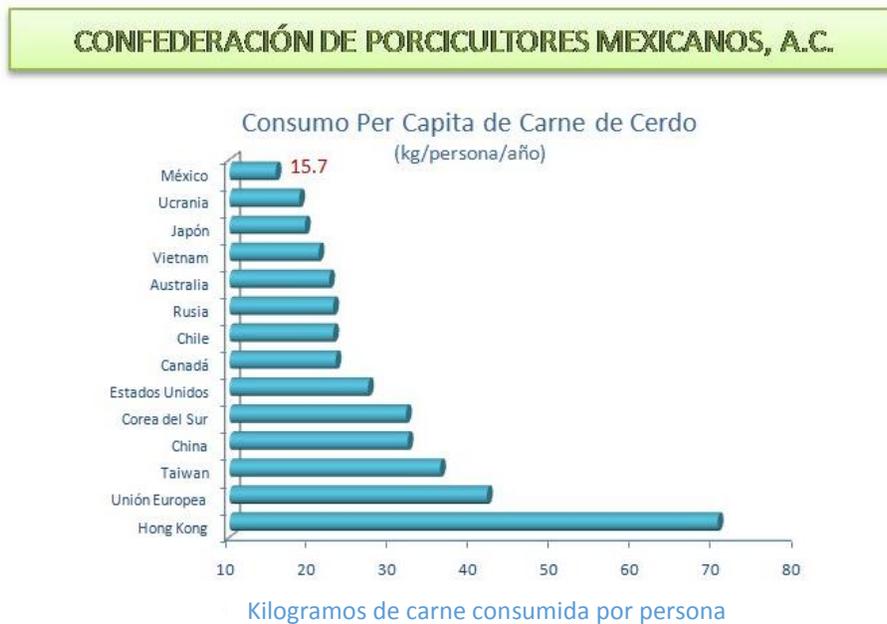
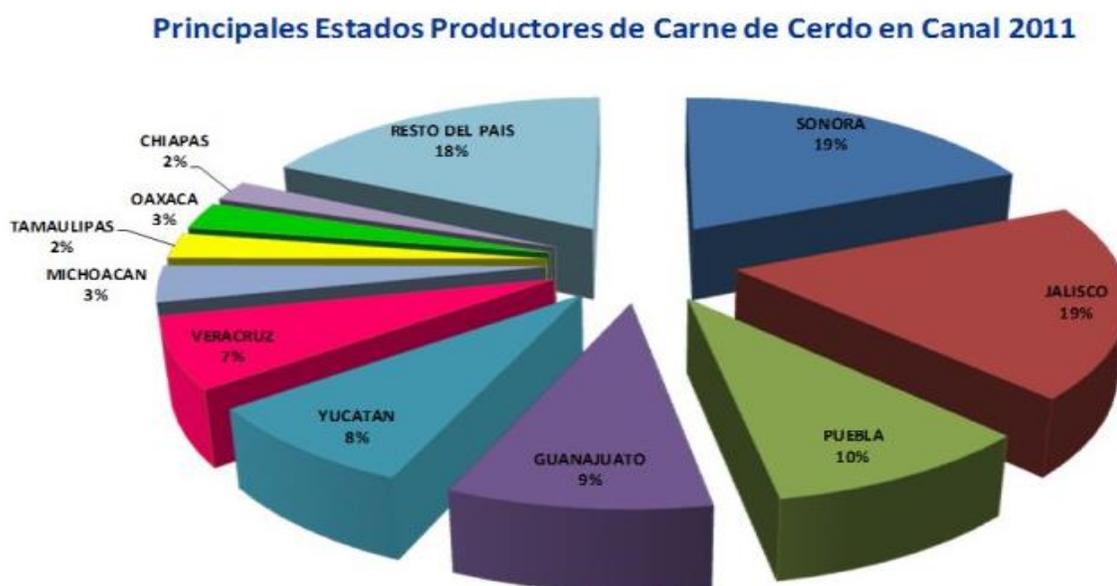


Fig. 4 Consumo de carne de cerdo por año. ⁽¹⁸⁾

Los principales estados productores en el país son Sonora, Jalisco, Puebla, Guanajuato, Yucatán, Veracruz, Michoacán, Tamaulipas, Oaxaca y Chiapas.



Fuente: CPM, elaborado con datos del Sistema de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP)

Fig. 5 Principales estados productores de carne de cerdo en México ⁽¹⁸⁾

Estos datos han promovido de manera positiva la producción, y se ha buscado promover el consumo de esta carne entre la población. También se ha buscado la posible apertura del mercado en países de Europa, Asia y América, tratando de impulsar la producción primaria. ⁽¹⁸⁾

Este panorama de creciente producción de carne de cerdo debe seguir siendo aprovechado por la población para impulsar empleos y una fuente de proteína de origen animal inocua para la población. ⁽¹⁸⁾

Es por esto que debemos seguir innovando técnicas que reduzcan cualquier tipo de enfermedad (por ejemplo el Complejo Respiratorio Porcino o CRP) que limiten la ganancia de peso, impactando directamente en la economía del productor.

El complejo respiratorio porcino se asocia a pérdidas en la ganancia de peso, deficiencia alimentaria y mortalidad en los animales. Se ha reportado que por cada 10% de lesión pulmonar hay una depresión en la ganancia de peso de 37.4 g. Esto puede retrasar el que los animales lleguen al peso de mercado, incluso 1.2 días más. ⁽¹⁹⁾

Pasteurelosis porcina

Agente etiológico.

Pasteurella multocida

Es un cocobacilo Gram negativo, inmóvil, que mide de 0.3 – 1.0 μm por 1.0 – 2.0 μm .

Las cepas de *P. multocida* se han agrupado en cinco serogrupos capsulares diferentes: A, B, D, E y F, y estos a su vez se han clasificado en 16 serotipos somáticos. Hasta la fecha, solo los serogrupos A y D se han aislado del cerdo. ⁽²⁰⁾

El lipopolisacárido de la pared, actúa como antígeno de la bacteria. El serogrupo A contiene ácido hialurónico en su cápsula, mientras que el serotipo capsular D contiene heparina y condroitina. ⁽²⁰⁾

La patogenicidad de *P. multocida* se asocia a diversos factores de virulencia, tales como la cápsula y sus lipopolisacáridos, algunas adhesinas, toxinas, sideroforos, y proteínas externas de membrana. ⁽²⁰⁾

Estos factores de virulencia facilitan la colonización y la invasión de las bacterias hacia vías respiratorias inferiores del cerdo, así como la interrupción de los mecanismos de defensa del hospedero. Causan daño en los tejidos y/o estimulan la respuesta inflamatoria. ⁽²⁰⁾

***Pasteurella multocida* como parte del Complejo Respiratorio Porcino (CRP)**

La *Pasteurella multocida* es uno de los principales agentes causales del CRP, esta necesita varios factores predisponentes, para su presentación. *P. multocida* es parte de la microbiota normal del tracto respiratorio del cerdo, principalmente se ubica a nivel de fosas nasales y tonsilas. Necesita un patógeno primario que destruya las defensas del hospedero, para posteriormente colonizar vías respiratorias altas y causar el daño que se observa en pulmones. Las afecciones de tipo neumónico se relacionan principalmente con los serotipos A y D de *Pasteurella multocida*, existiendo cepas toxigénicas y no toxigénicas. ⁽²²⁾

La enfermedad se desarrolla en las etapas de finalización de la engorda, en cerdos aproximadamente de 5 a 6 meses de edad. Uno de los principales factores predisponentes es el estrés, aunado a una mala ventilación, corrales húmedos, etc. ^(22, 23-24)

La pasteurelosis puede tener presentaciones agudas, sub agudas y crónicas. En la presentación aguda de la enfermedad, los animales presentan disnea, les cuesta trabajo respirar de manera normal, por lo que generalmente lo hacen contrayendo la cavidad abdominal, en vez de cavidad torácica. Su temperatura puede llegar a los 42 °C, provocando anorexia y depresión en los animales afectados. ⁽²²⁾



Fig. 6 Cerdo en posición “sentado” y con respiración abdominal.

La forma subaguda está asociada con las cepas que producen pleuritis, que generalmente son de tipo capsular A no toxigénicas. ^(20, 22)

La forma crónica es la más común. Los signos clínicos llegan a ser inaparentes o pueden observarse animales con tos ocasional, aunque generalmente los animales afectados presentan alteraciones en los índices productivos (retraso en el crecimiento, disminución en la ganancia diaria de peso, aumento en los índices de conversión, peso bajo de los animales). La muerte de estos animales es por fallo respiratorio o a consecuencia de un choque endotóxico. ⁽²⁰⁾

Lesiones

Las lesiones provocadas se limitan a la cavidad torácica. Generalmente se observa una consolidación anteroventral del pulmón (Figura 6). Existe una delimitación entre tejido sano y tejido afectado, dependiendo del curso de la infección. ^(20, 22)

En la figura 7 se observan lesiones compatibles con *Pasteurella multocida* y otras bacterias implicadas en el CRP.



Fig. 7 Pulmón consolidado ^{Benzaquén, 2009}

La bacteria *Actinobacillus pleuropneumoniae* también provoca adherencias en la pleura, observándose esta con aspecto húmedo, amarillenta e infiltrados masivos de fibrina. A diferencia de *P. multocida*, las pleura presenta un aspecto translúcido y seco, tal como se observa en la figura 8. ⁽²⁵⁾

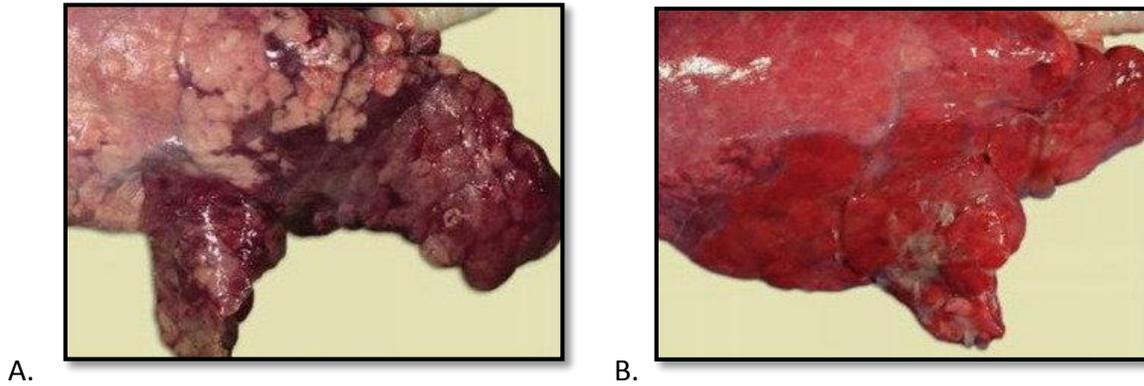


Fig. 8 En la foto A se observa la consolidación craneoventral, se observa color rojo oscuro a rojo grisáceo. El pulmón sano se observa rosa pálido. En la foto B. se observa también la consolidación craneoventral de los lóbulos, y además la formación de pseudomembranas sobre la pleura del área afectada. ⁽²⁵⁾

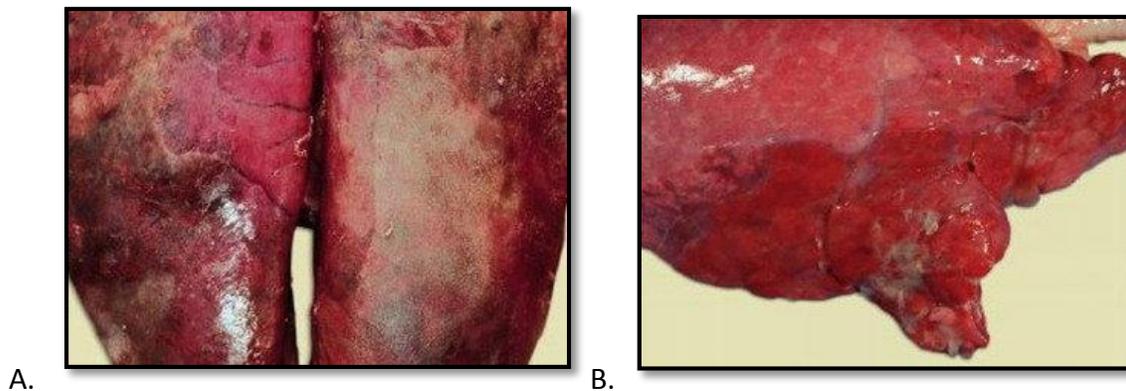


Figura 9. En la fotografía A, se observan los pulmones voluminosos con consolidación sin un patrón de distribución definido. La pleura se observa engrosada y amarillenta. En la figura B. la pleura se observa seca, translúcida y la fibrina no cubre toda el área de consolidación. ⁽²⁵⁾

Diagnóstico

Para su diagnóstico es necesario considerar los signos clínicos en conjunto con la historia clínica del hato. Para confirmar la pasteurelisis se debe aislar a la bacteria a partir de los pulmones de los animales afectados. ⁽²⁰⁻²³⁾

De las lesiones fibrinosas o abscesos de la muestra, se siembra en agar sangre, mediante las técnicas de aislamiento de cultivo. Después de 24 horas se toman las colonias características para obtener un cultivo puro: color gris azulado, no hemolíticas, de aspecto mucoso de 1 – 2 mm de diámetro, tal como se observa en la figura 9. Se identifica el género y especie mediante las siguientes pruebas bioquímicas: Tinción de Gram negativa, reacciones de oxidasa y catalasa positivas, reducción de los nitratos a nitritos, producción de indol, la descarboxilación de la ornitina y una reacción de urea negativa. ⁽²⁶⁾



Fig. 10 Crecimiento de colonias de *Pasteurella multocida* en agar sangre. Sabaleta 2015

Tratamiento

Los antibióticos parenterales y por vía oral son eficaces, si los microorganismos no son resistentes a ellos. Algunos ejemplos de antibióticos empleados son: florfenicol, amoxicilina, norfloxacin, tilmicosina, valnemulina, tiamulina. Sin embargo, en las últimas décadas se ha observado el incremento de la resistencia a antimicrobianos no solo de *P. multocida* sino de otros microorganismos. ⁽²⁷⁾

El uso indiscriminado de antibióticos a altas dosis ha provocado que aparezcan cepas multirresistentes y por consecuencia la baja eficiencia en los tratamientos, lo cual ha llegado a ser un motivo de preocupación a nivel mundial; incluso está bien documentada la existencia de cepas multirresistentes. ^(20,23.27-29)

Aunado a esto, los tratamientos para infecciones por *P. multocida* con antimicrobianos comúnmente son infructuosos y tardados, por la dificultad de alcanzar una concentración adecuada de antimicrobiano en un pulmón con consolidaciones. ⁽²⁰⁾

P. multocida es susceptible *in vitro* a muchos antimicrobianos, aunque se citó anteriormente, cada vez con más frecuencia aparece un mayor número de resistencias. ^(20,28)

En la práctica se suelen formular combinaciones de distintos antimicrobianos que son administrados de forma parenteral o con el alimento. ⁽³⁰⁾

Prevención

La prevención es fundamental, ya que la terapia antimicrobiana es, normalmente, inefectiva y cuando es efectiva puede no resultar rentable. Normalmente lo más eficaz es aplicar cambios en el manejo, que suelen ir dirigidos a reducir los problemas respiratorios en general, sin atender a las diferentes etiologías. ⁽²⁰⁾

Estos cambios deben dirigirse a modificar el ambiente que rodea a los cerdos y a reducir la posibilidad de propagación de las bacterias. Por lo tanto, se ha de mejorar la ventilación, controlar la emisión de gases (oxígeno, dióxido de carbono, amoniaco -orina y heces-, monóxido de carbono, sulfuro de hidrógeno -agitación de purines-, controlar la temperatura y la humedad (50-70%), reducir en lo posible el polvo (pienso y animales) y aplicar una adecuada limpieza y desinfección. La mayoría de los desinfectantes comunes son eficaces. ⁽²⁰⁾

Además de todas las medidas citadas anteriormente, se deben controlar también otros patógenos mediante vacunaciones y/o tratamientos profilácticos. ⁽²⁰⁾

Propóleo en Medicina Veterinaria

Kivalkina inició el estudio científico de este producto en 1947, en el Instituto Veterinario de Kazán, en la antigua Unión Soviética. Se conocía que las abejas recubrían los restos de animales muertos dentro de la colmena. Así los aislaban y evitaban su descomposición, por lo que se dedujo la existencia de algunas propiedades antimicrobianas. ⁽³¹⁾

La aplicación de este producto en medicina veterinaria, se ha basado en esta propiedad. Estudios demuestran que interviene como principio activo contra un gran número de agentes que afectan a los animales.

A continuación se presenta una tabla en donde se observan algunas aplicaciones del propóleo en diferentes enfermedades de los animales.

Tabla 1. Aplicaciones del propóleo en Medicina Veterinaria

PROPÓLEO EN MEDICINA VETERINARIA
Mastitis: Uso tópico en la ubre.
Enfermedades ginecológicas.
Alimentación de cerdos débiles.
Prevención y control de enfermedades en patas de ovinos.
Ungüentos para queratitis y conjuntivitis infecciosas.
Onfalitis del ternero.
Reproducción.
Endometritis
Preventivo de las enfermedades gastrointestinales y respiratorios de cerdos.
La alimentación con propóleos al 0.5% en leche mejora la ganancia de peso en becerros.
Reduce la diarrea en becerros con dosis de 5 mL de extracto etanólico al 20%.

Tomado de Bogdanov, 2012. ⁽³¹⁾

En cerdos, el tratamiento preventivo para neumonías provocadas por *Pasteurella multocida*, aún no ha sido estudiado. No se han encontrado investigaciones relacionadas a esta enfermedad. Uno de los estudios que más se acerca a esta investigación en México, se llevó a cabo con *Pasteurella multocida* de origen cunícola. Se evaluaron cinco propóleos de diferentes estados de la República Mexicana, obteniendo que el propóleo del estado de Querétaro tuvo mejor efecto antimicrobiano frente a *Pasteurella multocida*.⁽¹²⁾

Hay cada vez más investigadores realizando experimentos evaluando propóleo, y se han obtenido buenos resultados, ofreciendo tanto a animales como a personas una alternativa natural. Hasta la fecha, no hay información que indique que los microorganismos hayan generado resistencia a los propóleos. Por el contrario, su administración es benéfica para el organismo, aumentando su inmunidad.⁽³²⁻³³⁾

Justificación

El uso indiscriminado de los antibióticos en la industria porcícola ha hecho que las bacterias generen resistencia a éstos, lo que repercute directamente en la eficiencia en el combate de las enfermedades, incrementando el tiempo de resolución de los problemas y aumentando el costo en la producción. ^(31, 34)

Sin perder de vista que el uso indiscriminado de antibióticos en los animales destinados al consumo humano pueden ser un riesgo de salud pública, por la exposición indirecta de estos provocando resistencia en los humanos.

Además debemos considerar el tiempo después del retiro de los antibióticos para la comercialización del animal para ofrecer al público carne de buena calidad.

Por todo esto debemos de iniciar la búsqueda de alternativas médicas naturales para prevenir infecciones en los animales. Una de estas alternativas es el uso del propóleo como agente antimicrobiano.

El presente trabajo pretende fundamentar el uso del propóleo como tratamiento preventivo de las neumonías en cerdos, ya que es un antimicrobiano natural, que hasta la fecha no ha tenido reportes de resistencia bacteriana, y la toxicidad tampoco se ha reportado en animales.

Hipótesis

Si el Extracto Etanólico de Propóleo produce un efecto antibacteriano sobre *Pasteurella multocida*, es posible que genere daño estructural en la bacteria que sea observado mediante microscopia electrónica lo que permitira dilucidar el posible mecanismo de acción de este producto.

Objetivos

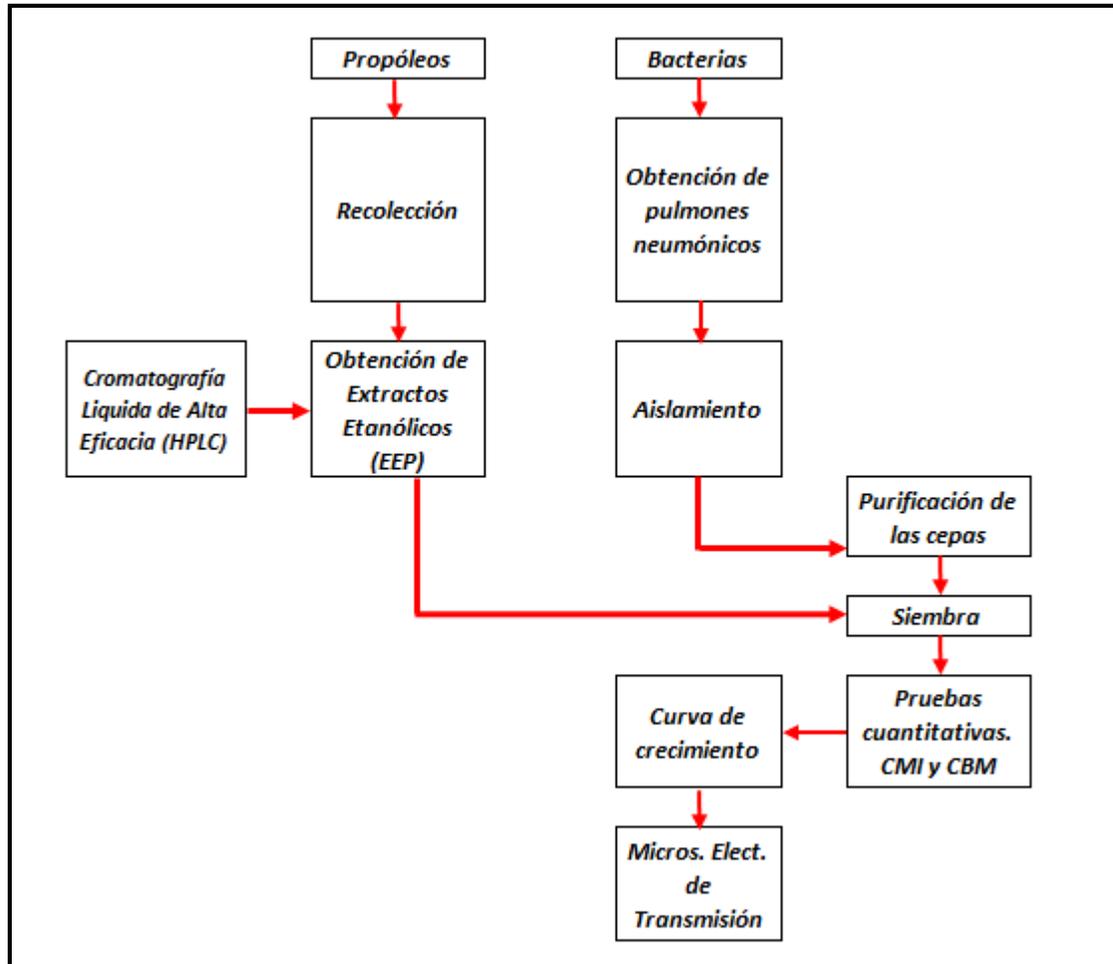
General:

Evaluar la actividad antimicrobiana in vitro de propóleos mexicanos contra cepas de *Pasteurella multocida* de origen porcino mediante pruebas de sensibilidad y determinar su posible mecanismo de acción al observar cambios en la estructura celular de la bacteria producidos por estos productos, por medio de microscopía electrónica, todo ello con la finalidad de fundamentar su posible uso como tratamiento preventivo de las neumonías provocadas por esta bacteria en cerdos.

Particulares:

1. Obtener el extracto etanólico de cada propóleo recolectado.
2. Obtener cepas de *Pasteurella multocida* a partir de pulmones neumónicos de cerdo.
3. Mediante la técnica cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), determinar los componentes presentes en las muestras de propóleos recolectados.
4. Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria y la Concentración Bactericida Mínima por cepa de *Pasteurella multocida*.
5. Análisis del efecto del EEP sobre la curva de crecimiento de *Pasteurella multocida*.
6. Mediante microscopía electrónica, observar los posibles daños causados por el propóleo en la estructura celular de la bacteria.

Diseño experimental



Material y Métodos

Cosecha del Propóleo

La cosecha del propóleo se realizó directamente en la colmena, obteniendo la greña de los cinco apiarios localizados en diferentes estados de la República Mexicana (figura 11) donde las condiciones geográficas, climáticas y de flora fueron distintas.

Ubicación de los apiarios



Fig. 11 Mapa de la República Mexicana en donde se muestran los estados de donde fueron obtenidas las muestras de propóleo. 1. Guanajuato (San Jose Iturbide), 2. Michoacán (Tlalpujahuá), 3. Edo. De México (Cautitlán Izcalli, Villa del Carbón), 4. Puebla (Tianguismanalco). Pérez, 2013

a) Cuautitlán Izcalli, Edo. De México. (Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán)

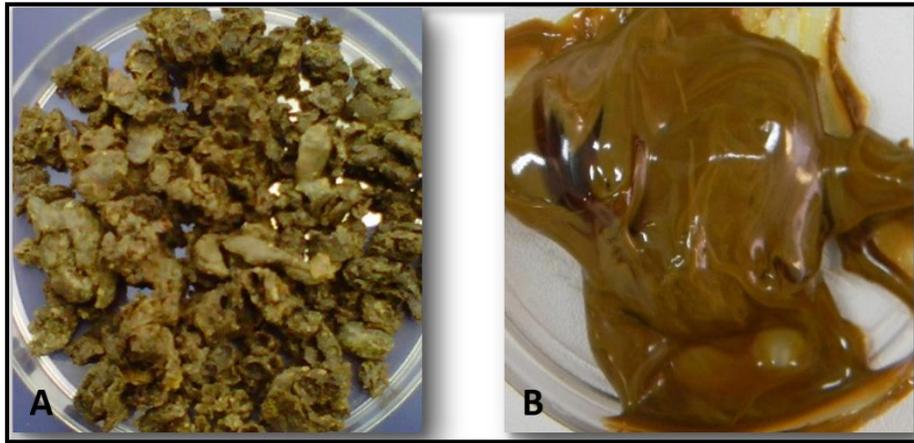


Fig. 12 Se muestra el propóleo en greña limpio (A) y el extracto etanólico (B). Pérez, 2013

Fecha de recolección: abril 2013

Localizado al noroeste del Valle de México. Cuautitlán Izcalli se ubica a 19° 40' 50'' de la latitud norte y a los 99° 12' 25'' de la longitud oeste. Con una altura promedio de 2,252 metros sobre el nivel del mar.

Con un clima definido como templado subhúmedo, con lluvias en el verano, y una humedad relativa de 677.88 mm, en el 69.4% en su superficie.

Presenta una temperatura promedio media anual es de 16°C. Cuya variación máxima alcanza los 27.8°C y como mínima de 5°C.

En la conurbación de la Facultad, la flora más representativa incluye fresnos, pinos, cedros, eucaliptos entre otros, siendo los más comunes los árboles de cepillo (*Callistemon citrinus*).⁽¹⁷⁾

b) Villa del Carbón, Edo. de México



Fig. 13 Se muestra el propóleo en greña limpio (A) y el extracto etanólico (B). Pérez, 2013

Fecha de recolección: 2012

Situado en el Norte del Estado de México, Villa del Carbón se ubica en las coordenadas 19° 54' 24" latitud norte y 99° 39' 07" longitud oeste; mínimas 19° 36' 48" latitud norte y 99° 22' 21" longitud oeste. A una altura de 2600 metros sobre el nivel del mar.

Con un clima templado la mayor parte del año y un invierno frío, y una temperatura media anual de 14.5 °C y máximas 20 °C con humedad relativa constante y precipitación pluvial de 998 mm.

Cuenta con un paisaje boscoso de relieve montañoso, con una flora representativa de bosques de coníferas (oyamel), bosques de latifoliadas (encino), bosques mixtos y pastizal inducido, eucalipto, pirul, madroño, trueno, ayle y sauce llorón, entre otros.

c) Talpujahua, Michoacán



Fig. 14. Se muestra el propóleo en greña limpio (A) y el extracto etanólico (B). Pérez, 2013

Fecha de recolección: mayo de 2013

Este propóleo fue recolectado en la conurbación de la Reserva Natural “Biosfera Mariposa Monarca”, ubicada entre los municipios de Talpujahua y Senguio Michoacán. Sus coordenadas geográficas son: 19° 48' 18" Norte, 100° 10' 26" Oeste.

A una altitud de 2595 metros sobre el nivel del mar. Presenta un clima templado frío, con lluvias en verano, con una precipitación pluvial de 700 a 1200 mm anuales. Con una temperatura promedio anual de 14.4 °C, con variaciones de 6°C a 22.7 °C.

La comunidad vegetal dominante son los pinares, conformados básicamente por pino lacio o pacingo, se incluyen también al ocote, tlacocote u ocote chino, pino mexicano amarillo o pino patula. Las especies herbáceas más representadas son: *Alchemilla* (rosas), *Braccharis* (romerillo), *Arenaria* (arenaria), entre otras.

Los agrosistemas incluyen reforestaciones de *Pinus* (pinos) y *Cupressus* (ciprés), huertas de caducifolios.

d) San José Iturbide, Guanajuato

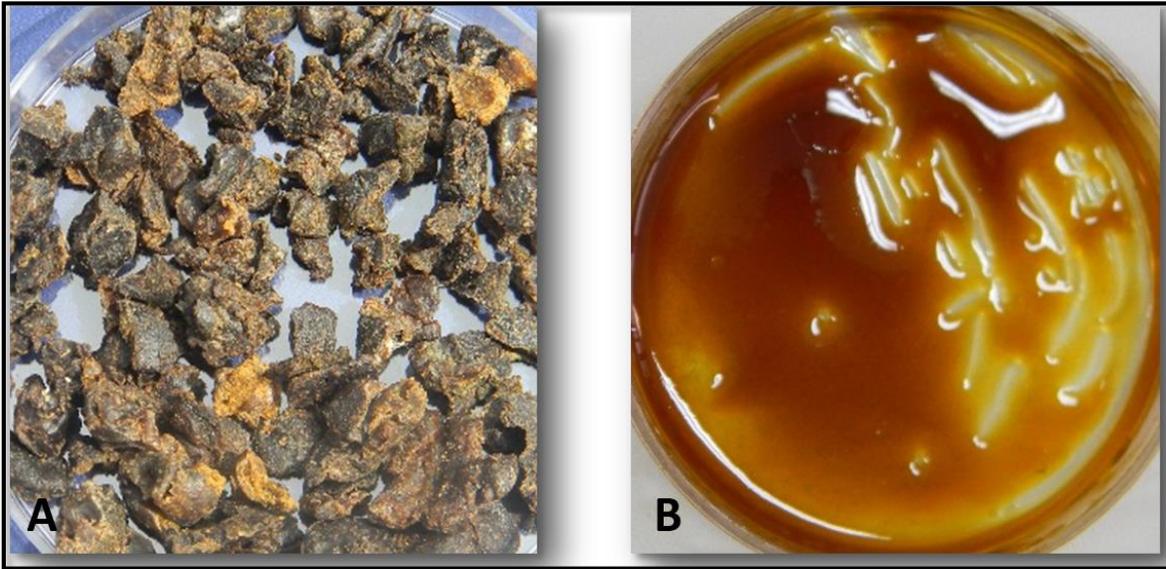


Fig. 15 Se muestra el propóleo en greña limpio (A) y el extracto etanólico (B). Pérez, 2013

Fecha de recolección: abril de 2013

Este apiario se encuentra en la comunidad de Pozo Blanco del Capulín, en el municipio de San José Iturbide, Guanajuato. Ubicado en las coordenadas: al norte 21° 07', al sur 20° 53' de latitud norte; al este 100° 14'; al oeste 100° 32' de longitud oeste. Y a una altura de 2090 metros sobre el nivel del mar.

La temperatura promedio es de 17.8 °C, con mínimas de 15.5 °C; y máximas es de 23.5 °C. La precipitación anual promedio de 100 mm.

La flora del municipio está constituida por especies forrajeras como el zacatón, falsa grama, triguillo, gramilla, popotillo plateado y lobero. Además se cuenta con otras especies, como nopal, huisache, mezquite, maguey verde, granjeno, ocotillo, capulín, cayotillo, pirul y garaballo entre otros.

e) Tianguismanalco, Puebla

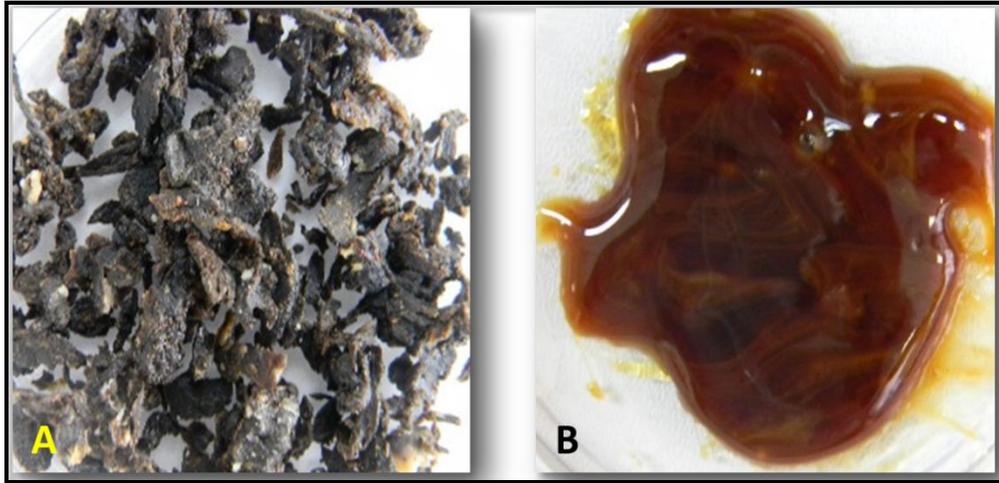


Fig. 16 Se muestra el propóleo en greña limpio (A) y el extracto etanólico (B). Pérez, 2013

Fecha de recolección: Nov-Dic del 2012

Esta cosecha de propóleo fue recolectada en el municipio de Tianguismanalco Puebla, en la parte centro oeste del estado, en los paralelos $18^{\circ} 57' 18''$ y $19^{\circ} 03' 12''$ de latitud norte y los meridianos $98^{\circ} 24' 42''$ y $98^{\circ} 34' 00''$ de longitud occidental. A una altitud de 2140 metros sobre el nivel del mar.

En este municipio predominan dos climas el templado subhúmedo que es el clima predominante y el semifrío ambos con lluvias en verano con una temperatura promedio de 16.8°C y una precipitación pluvial de 880 mm.

La mayor parte del municipio presenta zonas dedicadas a la Agricultura de temporal. Aunque también existen bosques de encinos y pino principalmente.

Metodología de la Extracción Etanólica de Propóleos. (EEP) ⁽¹⁷⁾

Este proceso se llevó a cabo en las instalaciones de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campo 1, en el laboratorio 121 del edificio de Química Orgánica.

El primer paso consistió en eliminar las impurezas de los propóleos en greña. Una vez que limpios, se pesó el total del volumen.

Éste se macero y se colocó en frascos ámbar agregándoles etanol al 70%, en relación 3:1 peso/volumen, alcohol: propóleo.

Esta mezcla se mantuvo durante 72 horas (tres días) en un lugar fresco y apartado de la luz del sol, agitándose durante 10 minutos una vez por día.

Pasado este tiempo se filtró, mediante papel filtro Whitman del No. 5 para separar las partículas más grandes.

Dicho extracto se sometió a un proceso de concentración mediante un Rotavapor (Büchi R-205, B-490) donde se buscó la eliminación del alcohol y la extracción pura del EEP, bajo las siguientes constantes: Revoluciones de rotación: 85, Temperatura de vapor: 27 °C y Temperatura del baño María: 55 °C.

Por último, el resultado de la concentración permaneció 7 días en una bomba de vacío para eliminar el remante de líquido. ¹⁵⁽¹²⁾



Fig. 17 Proceso de filtración y recuperación de etanol en el rotavapor Pérez, 2013

Aislamientos bacterianos

Para obtener las muestras de los pulmones con signos sugestivos de problemas neumónicos se acudió al proceso de sacrificio de cerdos, en el rastro TIF No. 194 “Abastos Cuautitlán”, ubicado en la avenida López Mateos # 39, de la colonia San Lorenzo Rio Tenco del municipio de Cuautitlán Izcalli.

En estas visitas se obtuvieron muestras de los pulmones de cerdo con lesiones características de neumonía, aislados en empaques estériles y conservados en refrigeración, para su traslado inmediato al laboratorio (15 minutos aproximadamente).

El aislamiento, purificación e identificación de las cepas obtenidas se realizaron en el laboratorio 5 de Microbiología Veterinaria, en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

A partir de 25 muestras de pulmones con lesiones sugestivas de problemas neumónicos se lograron aislar cinco cepas de *Pasteurella multocida*, bajo la siguiente metodología:

1. Acondicionamiento de la muestra.

Al arribo del laboratorio las muestras se fueron sometidas a un lavado con agua corriente para la eliminación del exceso de sangre, y ser colocadas en charolas de disección e identificar los focos que sugerían lesiones características de pasteurelisis, tal como se observan en las figuras 18 a 20.

Ya en ambiente de esterilidad (las muestras se procesaron entre mecheros Bunsen) se selló mediante una espátula flameada el pulmón (garantía de esterilidad), para hacer cortes y tomar de ahí la muestra para ser sembrada en agar sangre.

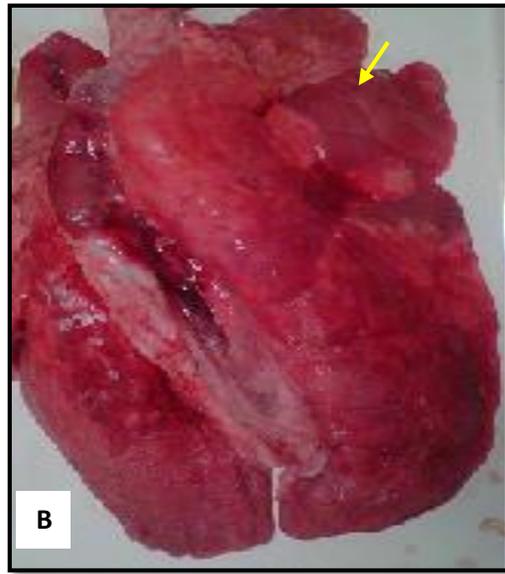
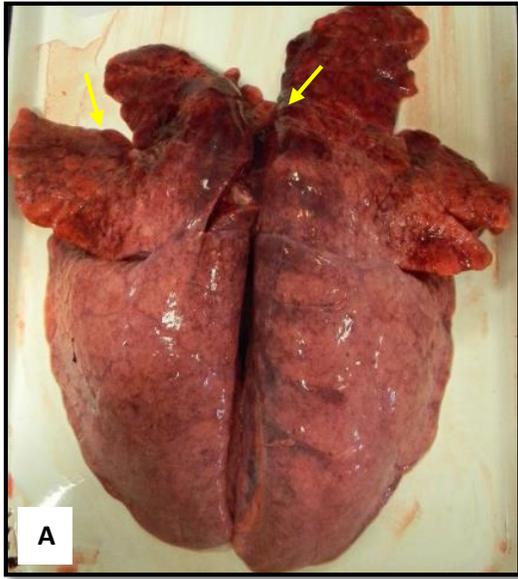


Figura 18. Pulmones neumónicos obtenidos del rastro TIF. En la foto A se observa consolidación pulmonar en los lóbulos cráneo-ventrales. En la foto B el lóbulo accesorio muestra hepatización. Pérez, 2013

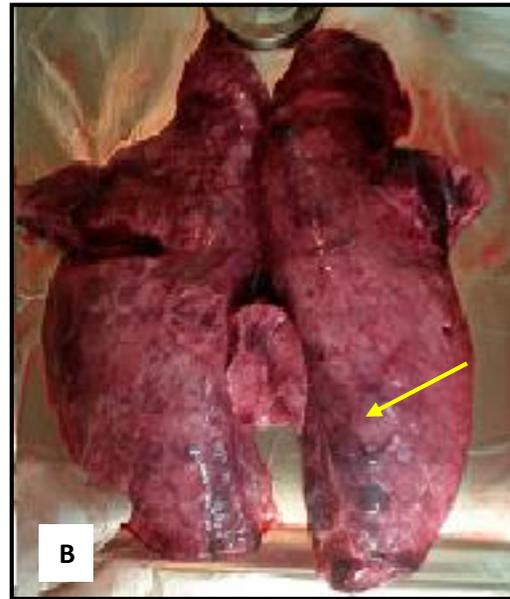
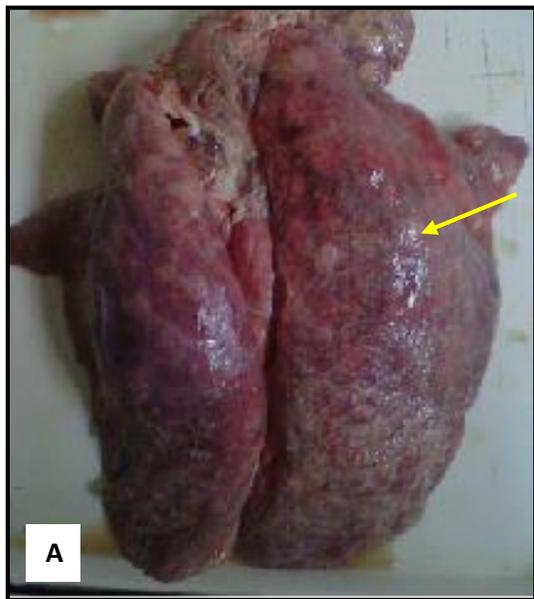


Fig. 19 En la figura A se aprecian depósitos de fibrina en pleura, consolidación difusa en forma de focos rojizos que dan a los pulmones un aspecto parcheado, signos sugestivos de neumonía por *Pasteurella multocida*. En la figura B se observa consolidación de los lóbulos frontales y petequias difusas. Pérez, 2013



Fig. 20 Pulmones aumentados de volumen por falta de colapso pulmonar. Pequeños focos pardo-rojizos de consolidación distribuidos por toda la superficie del órgano. Pérez, 2013

2. Siembra de la muestra.

Se tomó una muestra de cada órgano con asa bacteriológica y se sembró mediante las técnicas europeas y americana en placas de agar sangre (Dibico).

Las placas se incubaron durante 24 horas en una estufa bacteriológica a 37°C, posterior a esto se revisaron las placas y se seleccionaron las que tuvieron crecimiento con colonias bacterianas características (colonias blanquecinas de apariencia cremosa de aprox. 1 a 2 mm de diámetro).

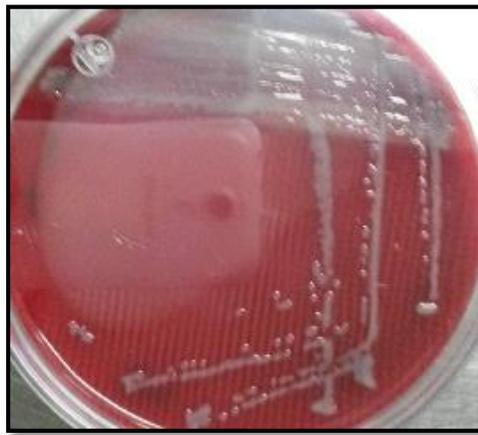


Fig. 21 Caja de agra sangre con crecimiento de *Pasteurella multocida*. Pérez, 2013

3. Purificación de la muestra.⁽³⁵⁾

De esta selección, se identificaron y purificaron las muestras mediante una nueva siembra en agar Sangre (Dibico) y poder multiplicar las colonias, con el fin de hacer una tercera siembra pero ahora en el medio de Müller Hinton, de donde se realizarían las pruebas bioquímicas de acuerdo a Cowan en el 1993:

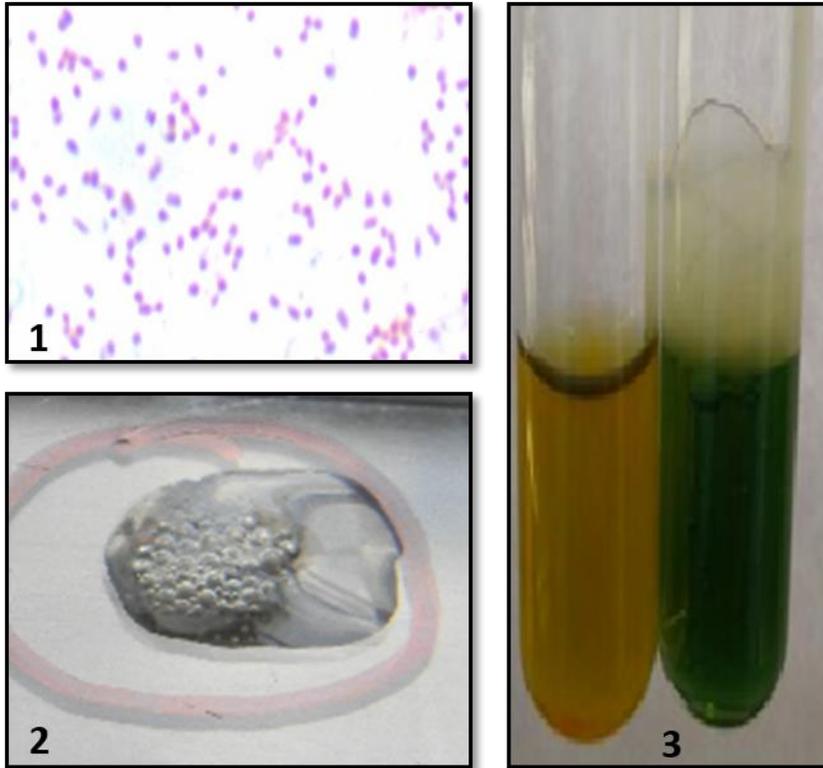


Fig. 22 1) Tinción de Gram. 2) Prueba de catalasa 3) Oxido/fermentación. Pérez, 2013



Fig. 23 1) Prueba de Indol, Ácido Sulfhidrico y Motilidad. 2) Prueba de Acriflavina. Pérez 2013

Pruebas de sensibilidad

Preparación del stock de propóleo

Se pesaron 48 mg de cada extracto, se colocó cada muestra en un tubo Eppendorf, y se les agregó 1 ml de etanol al 70 %.

Se agitaron con Vortex hasta que el extracto quedó bien disuelto.

Las diluciones que se probaron fueron las siguientes: 24, 12, 6, 3, 1.5, 0.75, 0.37, 0.18, 0.091, 0.046, 0.023, 0.012 mg/ml.

Evaluación de la actividad antimicrobiana.

Microtécnica de dilución en caldo ⁽³⁶⁾

Procedimiento

1. Preparación de reactivos

Para el estándar N° 0.5 de McFarland se añadió 0.5 mL (500 µL) de sulfato de bario (BaSO₄) y se aforó a 100 ml de H₂SO₄ a 0.36 N.

Para el Azul de tetrazolio (DTT) 0.08%: Se pesaron 0.08 g y se disolvieron en 100 mL de agua destilada.

2. Preparación de medios de cultivo.

Caldo Müeller-Hinton: Se pesaron 21 g y se disolvieron en 1 L de agua destilada. La mezcla se esterilizó a 121°C, 15 lb, 15 min.

Agar Müeller-Hinton: Pesar 38 g y disolver en 1 L de agua destilada. Calentar con agitación suave hasta su completa disolución. Esterilizar en autoclave a 121°C, 15 libras de presión por 15 minutos. Dejar enfriar y vaciar en cajas Petri estériles con 3 divisiones.

3. Preparación de la suspensión bacteriana

Realizar pruebas de identificación de la cepa de *P. multocida* antes de realizar la suspensión de bacterias.

- Tomar una asada de las colonias que se incubaron 24 horas previamente y sembrar en 5 mL de caldo Müller-Hinton.
- Incubar a 35°C durante 24 horas.
- Pasado este tiempo, preparar la suspensión bacteriana a una concentración de 1.5×10^8 UFC/mL, equivalente en turbidez al estándar N° 0.5 de McFarland. La comparación de la turbidez se realiza a 640 nm en el espectrofotómetro.

4. Stock de extracto etanólico de propóleo

- Pesar 15 mg y disolver 1 mL de etanol para obtener una concentración de 15 mg/mL.
- Tomar 100 μ L del stock y añadir a un tubo con 1 ml de caldo MH para obtener una concentración final de 1.5 mg/ml (Solución A).

5. Preparación de la microplaca

- Utilizar una placa de ELISA estéril de 96 pozos.
- Añadir 50 μ L de caldo MH en los pozos.

Nota: La prueba se realiza por triplicado, por lo que en las filas A, B y C se observa el efecto un EEP; en la fila D, E y F se coloca el EEP de otra procedencia. En la fila H se colocaron los controles positivos.

- Añadir 50 μ L de la solución A y colocar en A: 1, B: 1 y C: 1, que tendrán una concentración de 1.5 mg/mL. Mezclar perfectamente con el caldo MH.
- Tomar 50 μ L con ayuda de una pipeta multicanal y transferir 50 μ L a la siguiente columna. Así sucesivamente hasta llegar a la columna 12, donde se desecharán los últimos 50 μ L. (Esto se realizó con el objetivo de diluir la concentración de cada EEP).
- Añadir 50 μ L de la suspensión bacteriana a todos los pocillos utilizados.
- Sellar con papel parafilm e incubar 37°C por 24 horas.

6. Medición de la actividad respiratoria

- Después de incubar la microplaca, añadir 50 µL de la sal azul de tetrazolio al 0.08% a cada pozo inoculado.
- Mezclar perfectamente, tapar e incubar a 37°C durante 30 minutos.

Antibiograma ⁽³⁷⁾

El antibiograma se realizó para cada cepa de *Pasteurella multocida* a partir de cultivos sembrados en placa con 24 horas de incubación. Se tomaron las colonias necesarias para estandarizar a 0.5 en la escala de McFarland (640 nm en el espectrofotómetro y equivalente a 1.5×10^8 UFC/mL) 5 tubos de caldo Müeller Hinton, (un tubo por cada cepa).

A partir de estos tubos, se sembró una caja por aislamiento de *Pasteurella multocida* y se colocó un multidisco de antibióticos. Se incubaron en estufa bacteriológica durante 24 horas a 37°, como lo marca la Técnica de Difusión en Agar de Kirby-Bauer.

Se utilizó el Kit de Multidiscos combinados CAT. 71080380 (BIORAD).

A las 24 horas postinoculación se midieron los halos de inhibición producidos por los antibióticos sobre el crecimiento bacteriano y con las referencias de medidas se analizó si las bacterias fueron resistentes, susceptibles o tenían susceptibilidad media a cada uno de los antibióticos.

Los antibióticos empleados fueron:

Antibiótico	Abreviatura	Concentración
Amikacina	AK	30 µg
Ampicilina	AM	10 µg
Cefalotina	CF	30 µg
Ceftriaxona	CRO	30 µg
Cloranfenicol	CL	30 µg
Docloxacilina	DC	1 µg
Enoxacina	ENX	10 µg
Eritromicina	E	15 µg
Gentamicina	GE	10 µg
Netilmicina	NET	30 µg
Penicilina	PE	10 U
Trimetoprim-Sulfametoxazol	SXT	25 µg

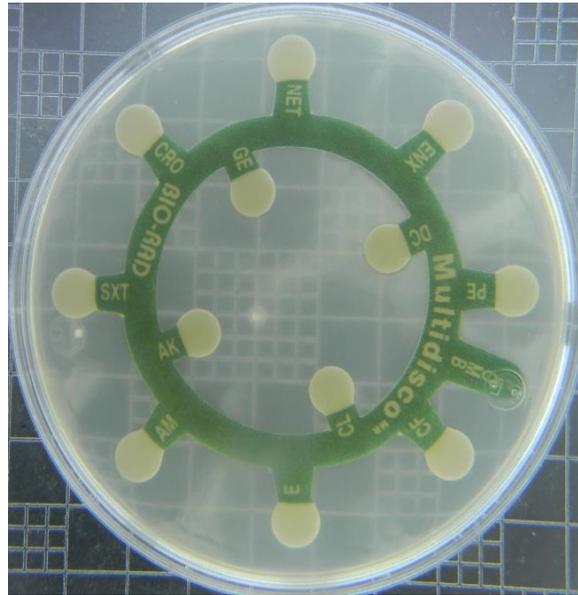


Fig. 24 Placa de agar Müller—Hinton con multidiscos de antibióticos para evaluar la resistencia o susceptibilidad de los aislamientos de *P. multocida*. Pérez, 2014

Curva de crecimiento bacteriano ⁽¹⁷⁾

Para realizar la curva de crecimiento de la bacteria, se eligió el aislamiento más sensible de *Pasteurella multocida* (1) y el EEP de FESC. Se inocularon 4 tubos de caldo MH con 10 ml cada uno. Se preparó la concentración de CBM (0.37 mg/mL), además de los controles: positivo (antibiótico) y negativo (solo bacteria).

De cada tubo se realizaron dos diluciones en 4.95 mL de solución salina fisiológica estéril (SSF) al 0.85%. De estos dos tubos se tomaron 100 µl para inocularlos en una placa de agar MH y se incubaron 24 horas a 37°C.

De cada tubo inoculado, se tomaron muestras periódicamente (cada tres horas) hasta las 24 horas y se realizó el mismo procedimiento de diluciones.

Por último se realizó el conteo de colonias de cada placa de agar.

Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) ⁽³⁸⁻³⁹⁾

Este análisis se llevó a cabo en el laboratorio de Farmacognosia de la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO), de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM.

La cromatografía líquida de alta eficacia se realizó en un Cromatógrafo de líquidos de alta resolución marca Hewlett Packard, Agilent Technologies series 1100 con un detector de arreglo de diodos (DAD por sus siglas en inglés) y equipado con el software Agilent Chem-Station for LC and LC/MS systems. Como fase estacionaria se empleó una columna Allsphere ODS-1 de 250 mm de longitud por un diámetro interno de 4.6 mm y un tamaño de partícula de 5 μm . La fase móvil estuvo conformada por metanol grado HPLC, acetonitrilo y agua destilada (25:25:50). Se estableció una longitud de onda de 254 nm, realizando un barrido completo de 200-400 nm a un flujo constante de 1 mL/min y un tiempo de corrida de 30 minutos.

Microscopía Electrónica ⁽⁴⁰⁻⁴¹⁾

Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM)

Las muestras obtenidas se fijaron en glutaraldehído al 2.5% por 48 hrs. Posteriormente se lavaron con solución amortiguadora de cacodilatos y posteriormente se fijaron con tetraóxido de osmio al 1% por 90 minutos en agitación suave.

Después de realizaron lavados con solución amortiguadora de cacodilatos con pH de 7.2 a 0.1 M. Posteriormente fueron deshidratadas con concentraciones ascendentes de acetona y se incluyeron en resinas epóxicas (Epon 812), y se polimerizaron a 60° C por 24 horas.

Una vez concluido el proceso de polimerización, se realizaron cortes semifinos de 120 nm de cada muestra y se montaron las laminillas, las cuales fueron contrastadas con azul de toluidina. A continuación se realizaron cortes finos de 60 μm montados en rejillas de cobre y se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo.

Las muestras posteriormente fueron trasladadas al laboratorio del Dr. Horacio Merchant del Instituto de Biomédicas de la UNAM para ser observadas mediante Microscopía Electrónica de Transmisión, en el donde se empleó el microscopio Jeol modelo 1010.

Resultados

Rendimiento de los propóleos

Luego del proceso de extracción podemos resumir en la tabla 2 el rendimiento obtenido a partir del propóleo en greña y la obtención del extracto.

Tabla 2. Rendimiento de los propóleos obtenidos en porcentajes

<i>Lugar de procedencia</i>	<i>Peso inicial</i>	<i>Peso del extracto</i>	<i>Rendimiento (%)</i>
Cuautitlán Izcalli, Edo. de México	234 g	91.35 g	39
Villa del Carbón, Edo. de México	200 g	51 g	30.86
Tlalpujahuá, Michoacán	70 g	30.25 g	43.2
San José Iturbide, Guanajuato	35 g	13.85 g	39.4
Tianguismanalco, Puebla	135 g	34.45 g	25.5

Cepas bacterianas

Se obtuvieron cinco 5 aislamientos de *P. multocida* tipo capsular D que fueron sometidas a pruebas de sensibilidad antimicrobiana frente a los EEP obtenidos y también se realizaron antibiogramas para conocer la sensibilidad a diferentes antibióticos.

Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Bactericida Mínima

Prueba de sensibilidad

La Tabla 3 muestra la Concentración Mínima Inhibitoria y la Concentración Bactericida Mínima de cada aislamiento evaluado con los cinco EEP.

Tabla 3. Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Bactericida Mínima de cinco cepas de *P. multocida* frente a diferentes propóleos.

Cepa	Cuautitlán Izcalli, Edo. de México		Villa del Carbón, Edo. de México		Tlalpujahua, Michoacán		San José Iturbide, Guanajuato		Tianguismanalco, Puebla	
	CMI (mg/ml)	CBM (mg/ml)	CMI (mg/ml)	CBM (mg/ml)	CMI (mg/ml)	CBM (mg/ml)	CMI (mg/ml)	CBM (mg/ml)	CMI (mg/ml)	CBM (mg/ml)
1	0.046	0.18	0.18	0.75	0.046	0.18	0.09	0.37	0.37	1.5
2	18	1.5	0.18	0.75	0.09	0.75	0.18	1.5	0.75	1.5
3	1.5	6	3	12	1.5	6	1.5	6	0.75	3
4	0.09	0.37	1.5	6	0.18	0.75	0.37	1.5	1.5	6
5	0.046	0.18	1.5	6	0.18	1.5	0.18	1.5	1.5	6

El EEP de Michoacán resultó ser el más efectivo para la cepa 2, con una CMI de 0.09 mg/ml y una CBM de 0.75 mg/ml. Para la cepa 3, tanto el propóleo de FESC como el de Michoacán resultaron tener las mismas CMI (1.5 mg/ml) y CBM (6 mg/ml).

En los resultados que se muestran en la figura 25, se puede observar que la cepa 3 es la menos sensible a los propóleos probados, mientras que las cepas 1 y 2 fueron las más sensibles.

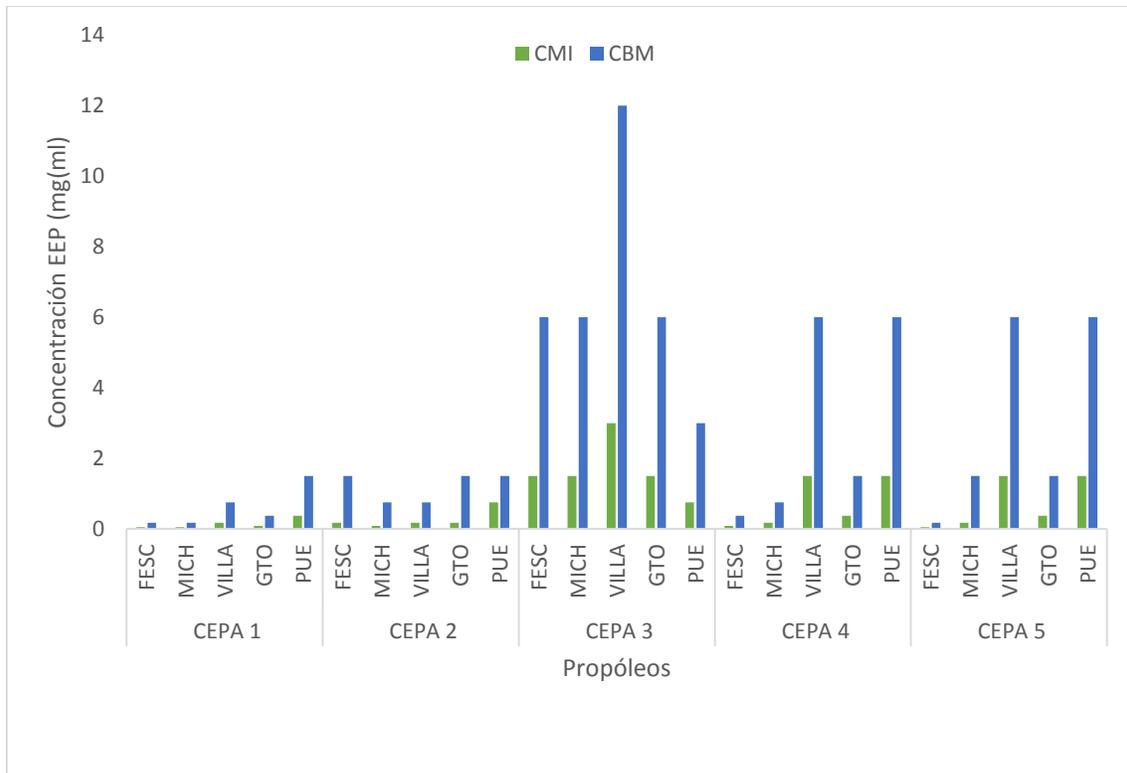


Fig. 25 Comparación de Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Bactericida Mínima de los diferentes propóleos frente a las cepas de *P. multocida*.

Los propóleos que presentan mejor actividad son los recolectados en el Estado de México (FESC) y Michoacán, pues las CMI obtenidas fueron las más bajas.

La Tabla 4 muestra los resultados de los antibiogramas realizados a cada una de las cepas desafiadas.

Tabla 4. Antibiograma de los aislamientos de *Pasteurella multocida*. Se pueden observar en color más negro los antimicrobianos a los cuales estas cepas fueron resistentes de acuerdo al tamaño del halo de inhibición que se obtuvo.

<i>Antimicrobiano</i>	<i>Cepa 1</i>		<i>Cepa 2</i>		<i>Cepa 3</i>		<i>Cepa 4</i>		<i>Cepa 5</i>	
	Halo de inhibición (mm)	Respuesta								
<i>AM</i>	19	S	21	S	21	S	22	S	19	S
<i>SXT</i>	15	I	23	S	9	R	17	S	15	I
<i>CRO</i>	23	S	26	S	25	S	28	S	23	S
<i>NET</i>	22	S	22	S	> 25	S	28	S	22	S
<i>ENX</i>	29	S	24	S	> 25	S	28	S	29	S
<i>PE</i>	13	R	14	R	8	R	15	R	13	R
<i>CF</i>	21	S	24	S	22	S	28	S	21	S
<i>E</i>	13	R	20	I	20	I	20	I	13	R
<i>AK</i>	15	I	16	I	0	R	17	S	15	I
<i>GE</i>	15	S	21	S	0	R	19	S	15	S
<i>DC</i>	0	R	0	R	0	R	10	R	0	R
<i>CL</i>	28	S	24	S	21	S	25	S	28	S

Abreviaturas de los antimicrobianos: AM – Ampicilina, SXT- Trimetoprim-Sulfametoxazol, CRO – Ceftriaxona, NET – Netilmicina, ENX – Enoxacina, PE – Penicilina, CF – Cefalotina, E – Eritromicina, AK- Amikacina, GE – Gentamicina, DC – Dicloxacilina, CL- Cloranfenicol.

Análisis estadístico

Las siguientes gráficas (fig. 26 y 27) muestran la comparación estadística entre medias obtenidas de los propóleos.

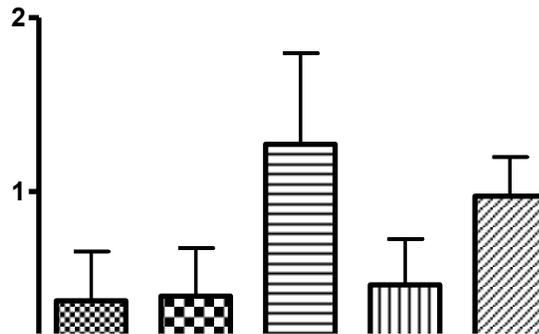


Fig. 26 Comparación estadística entre los cinco EEP. Aunque la Concentración Mínima Inhibitoria del EEP de Villa del Carbón parece mayor a las demás, el análisis no muestra diferencia significativa entre éste y los otros cuatro.

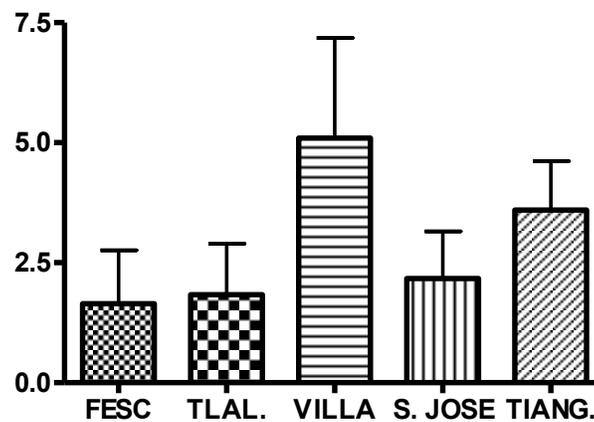


Fig. 27 Comparación estadística entre los cinco EEP. La Concentración Bactericida Mínima del EEP de Villa del Carbón parece mayor a las demás, el análisis no muestra diferencia significativa entre éste y los demás. Con esto se demuestra que el efecto antimicrobiano de los cinco EEP es eficaz ante *Pasteurella multocida*.

Análisis de propóleos mediante Cromatografía de Líquidos de Alta Eficacia

En la tabla 5 se resumen los compuestos encontrados en cada uno de los propóleos estudiados.

Tabla 5. Compuestos químicos encontrados en los extractos etanólicos de propóleos.

<i>Propóleo</i>	<i>Naringenina</i>	<i>Pinocebrina</i>	<i>Catequina</i>
Cuautitlán Izcalli, Edo. de México	X	X	
Villa del Carbón, Edo. de México		X	X
Tlalpujahuá, Michoacán	X	X	
San José Iturbide, Guanajuato		X	
Tianguismanalco, Puebla			X

En la tabla 6, podemos observar el porcentaje de abundancia de cada compuesto, así como su tiempo de retención.

Tabla 6. Tiempos de retención, porcentaje de abundancia, porcentaje de coincidencia, nombre y lambda de los EEP, de acuerdo a la biblioteca de datos del equipo de HPLC.

<i>Propóleo</i>	<i>Nombre</i>	λ	<i>Tiempo de retención</i>	<i>% de abundancia</i>	<i>% de coincidencia</i>
Cuautitlán Izcalli, Edo. de México	Naringenina	290	5.322	2.781066	96.6
	Pinocebrina	290	9.412	2.742934	100
Villa del Carbón, Edo. de México	Catequina	292	2.133	0.517092	97.4
	Pinocebrina	-	10.094	3.168212	99.7
Tlalpujahuá, Michoacán	Naringenina	290	5.408	3.6946	91.8
	Pinocebrina	292	10.366	3.931552	97.2
San José Iturbide, Guanajuato	Pinocebrina	292	10.273	0.871994	97.8
Tianguismanalco, Puebla	Catequina	290	3.232	4.870315	93.5

Curva de crecimiento

En la curva de crecimiento se observa que en la muestra sin tratamiento (solo bacteria) la fase exponencial de la bacteria fue a las 12 horas de incubación, y después de las 15 horas se aprecia la fase de muerte bacteriana. En la muestra que contiene la CBM (0.37 mg/ml) no se observa la fase exponencial ni la fase estacionaria de crecimiento de las colonias en ningún momento de la prueba. En la muestra con cloranfenicol (0.025 mg/ml) se observa el pico de la fase logarítmica a las 3 horas de incubación, y la fase de muerte se observa a partir de las 6 horas. Esto demuestra que este EEP tuvo un efecto bactericida (Ver Figura 28).

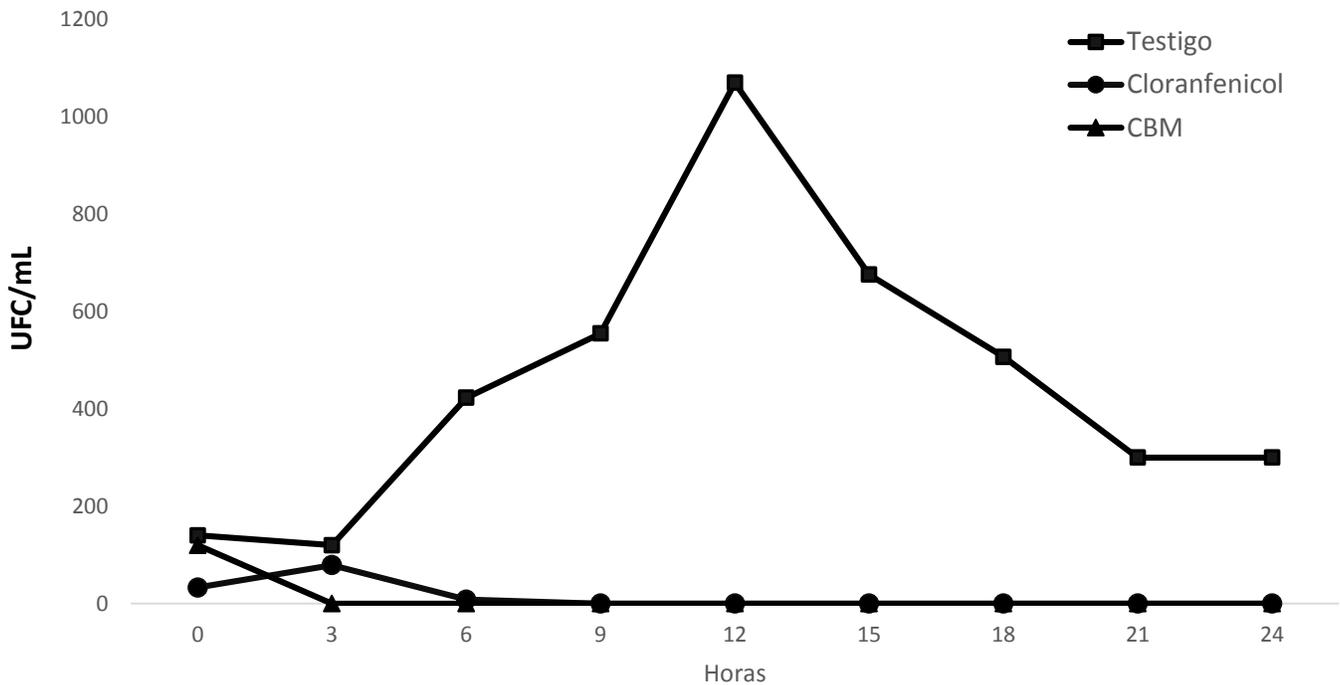


Fig. 28 Efecto del propóleo sobre *Pasteurella multocida* en caldo Müeller Hinton a 37°C: sin propóleo (■), propóleo 0.37 mg/ml (▲), cloranfenicol 0.025 mg/ml (●).

En la figura 29, se muestran tres placas que fueron inoculadas para comprobar la actividad del EEP empleando la CBM, el control con cloranfenicol y el control del tubo inoculado solo con *P. multocida*.

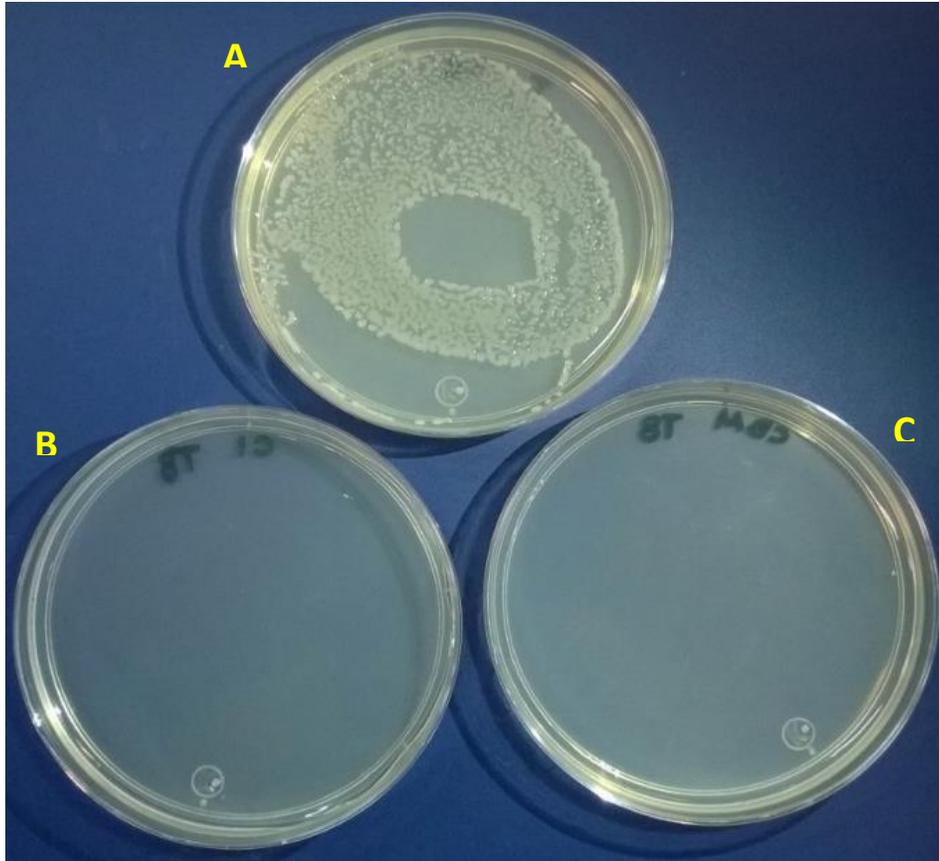


Fig. 29 A. Se muestra el crecimiento bacteriano de *Pasteurella multocida* a las 24 horas de incubación del tubo testigo sin propóleo. B. Control de cloranfenicol (0.025 mg/ml), C. Esta placa corresponde a la muestra con propóleo a 0.37 mg/ml (CBM).

Pérez, 2015

Microscopía Electrónica

Microscopía electrónica de transmisión (MET)

La cepa utilizada para la MET fue la 1 y el EEP fue el de Cuautitlán Izcalli. Estas muestras fueron tomadas de la prueba de curva de crecimiento.

La figura 30 presenta las micrografías electrónicas de *Pasteurella multocida* sin tratamiento. En ellas puede observarse la estructura normal de la bacteria, su membrana citoplasmática y pared celular intactas.

En las figuras 31 a 33 se presentan las micrografías electrónicas de *Pasteurella multocida* incubada 24 horas con EEP a una concentración de 0.37 mg/ml. En estas imágenes, se puede observar la pérdida de continuidad de la pared celular bacteriana y la salida del contenido celular. Así como la pérdida de la estructura “normal” de la bacteria.

Los hallazgos ultra estructurales revelan diversas alteraciones, entre las que se encuentran: ruptura de la cubierta celular con liberación de material intracelular, salida de contenido intracelular de la bacteria y formación de vacuolas dentro de la célula bacteriana.

También es visible la alteración en las estructuras de la pared celular.

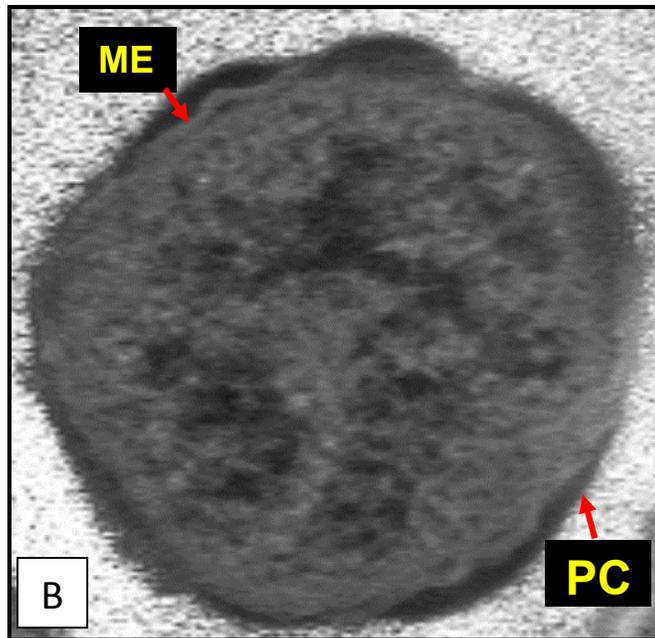
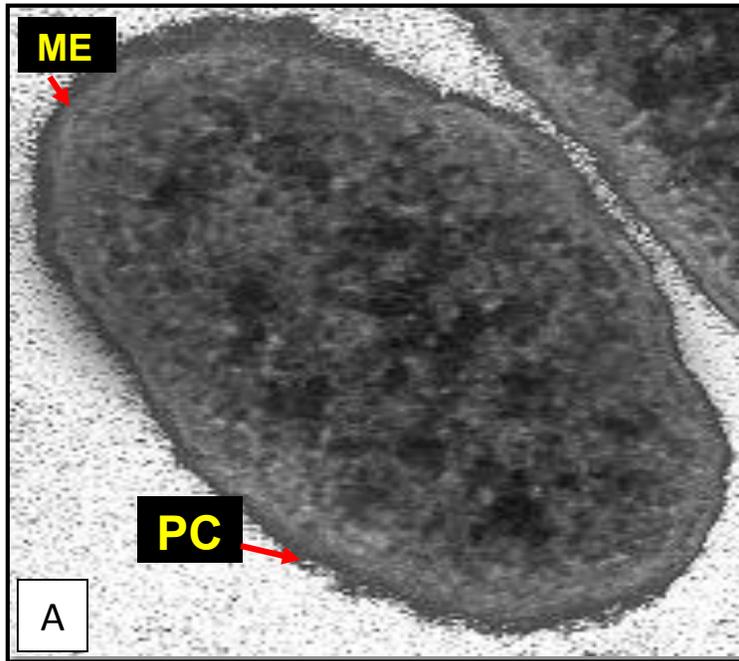


Fig. 30 Micrografías electrónica de transmisión de una *Pasteurella multocida* sin tratamiento. En la figura A y B se aprecian la membrana externa (ME) y pared celular (PC). (25000x) ^{Pérez, 2016}

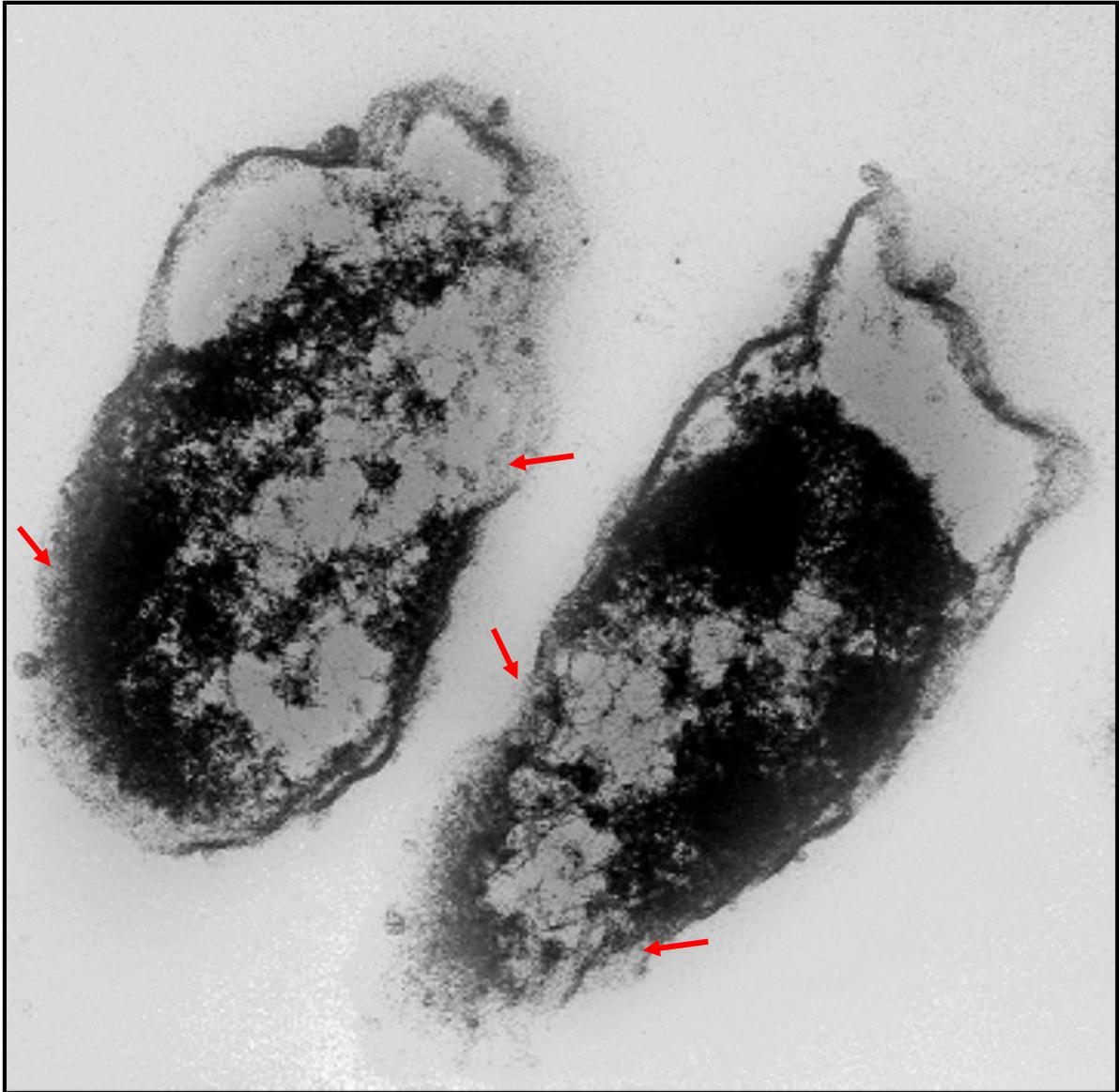


Fig. 31 Micrografía electrónica de transmisión de una *Pasteurella multocida* con tratamiento de extracto etanólico de propóleo a una concentración de 0.37mg/ml durante 24 horas (25000 x). Se aprecia una deformación de la estructura así como una discontinuidad (marcado con flechas) de la membrana citoplasmática (MC) y pared celular (PC). ^{Pérez, 2016}

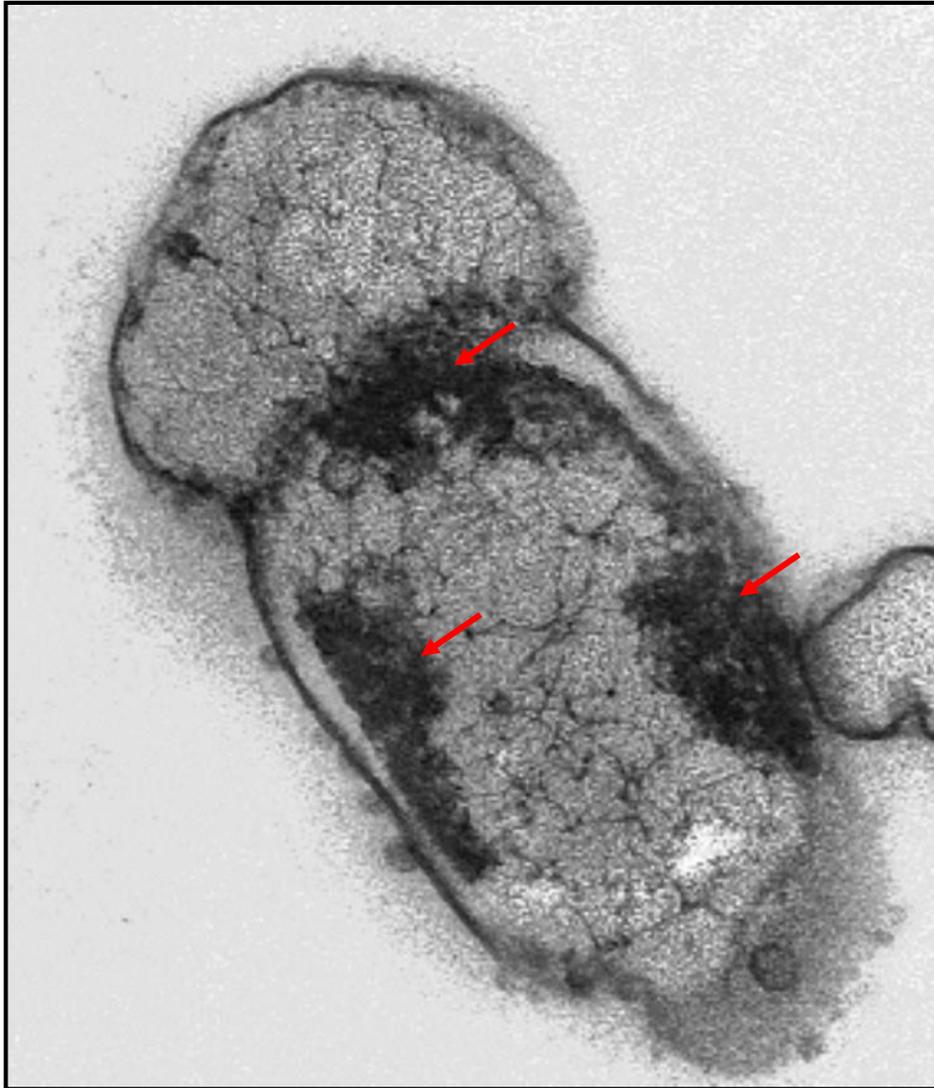


Fig. 32 Micrografía electrónica de transmisión de una *Pasteurella multocida* con tratamiento de extracto etanólico de propóleo a 0.37 mg/ml, durante 24 horas (25,000 x). En la figura 32 se aprecia una deformación de la estructura así como un cumulo de gránulos, el cual se señala por medio de flechas. ^{Pérez, 2016}

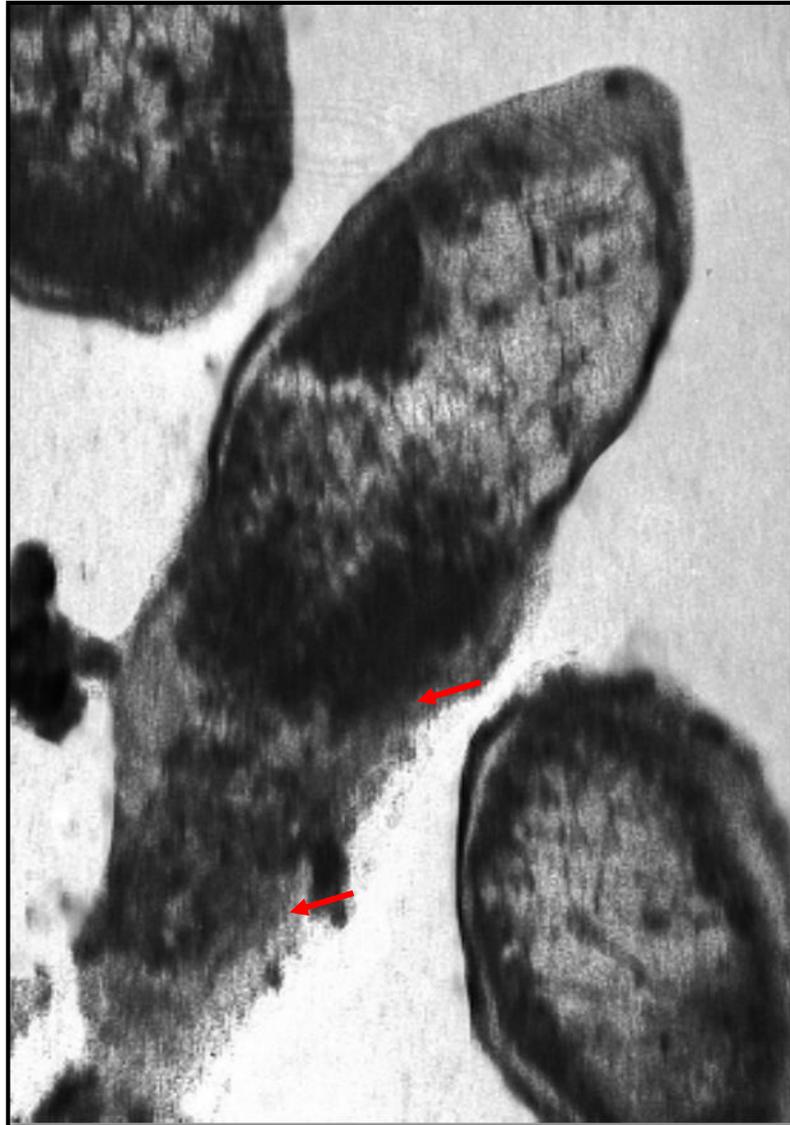


Fig. 33 Micrografía electrónica de transmisión de una *Pasteurella multocida* con tratamiento de extracto etanólico de propóleo a 0.37mg/ml, durante 24 hrs (25000x). Bacteria con ruptura de la pared celular y salida del contenido intracelular (flechas).^{Pérez, 2016}

DISCUSIÓN

Dada la escasa información del uso del propóleo en ganado porcino, este trabajo pretendió evaluar la actividad antimicrobiana de EEP de diferente origen contra uno de los principales agentes bacterianos productor de neumonías en cerdos.

En esta especie, existen reportes de propóleo empleado como aditivo para la prevención de diarreas en lechones destetados; existe otro estudio en donde comparan la actividad antimicrobiana entre un bálsamo de propóleo y sulfadiazina de plata aplicados en quemaduras en cerdos. ⁽⁴²⁻⁴³⁾

Hay reportes en donde se emplea como adyuvante en la aplicación de vacunas, inmunomodulador, además de emplearlo como promotor de crecimiento, sin embargo, no son estudios llevados a cabo en porcinos. ^(5, 16, 44-49)

Los propóleos empleados en este trabajo se obtuvieron de Cuautitlán Izcalli (FESC), Edo. de México, Tlalpujahua, Michoacán, Villa del Carbón, Edo. de México, San José Iturbide, Guanajuato y Tianguismanalco, Puebla, de los cuales se obtuvieron los siguientes rendimientos: Tlalpujahua con 43.2%, San José Iturbide con 39.4%, Cuautitlán Izcalli con 39%, Villa del Carbón con 30.86% y finalmente Tianguismanalco con 25.5 %.

En México, no hay reportes que indiquen actividad antimicrobiana de EEP sobre *P. multocida* de origen porcino, pero hay un estudio de propóleos de Campeche⁽⁵⁰⁾, en el que se reporta su actividad frente a otras bacterias Gram negativas, obteniendo CMI muy variadas, por ejemplo: en este estudio, se obtuvo una CMI de 0.046 mg/ml para *Pasteurella multocida* con los EEP de Cuautitlán Izcalli y Tlalpujahua, que comparada con *Pseudomona aeruginosa* (0.93 mg/ml) y *Salmonella typhi* (7.5 mg/ml), que también son bacterias Gram negativas, la concentración se observa mucho más abajo que las reportadas por Tolosa y Cañizares en 2002. ⁽⁵⁰⁾ Ellos utilizaron extractos etanólicos y acuosos de ocho localidades del estado de Campeche, México, encontrando que los extractos etanólicos de la localidad de Hampolol fueron los más efectivos. El tipo de vegetación encontrada en esta localidad es selva baja caducifolia, y las especies vegetales de esta región están conformadas por especies endémicas que aportan diferentes compuestos a estos propóleos. ^(46, 50)

En este trabajo, el aislamiento de *Pasteurella multocida* menos sensible a los EEP evaluados fue el número 3, ya que necesitó una CMI de 0.75 mg/ml, y este resultado se obtuvo con el EEP de Tianguismanalco. Se observa variación en los resultados obtenidos, sin embargo, las concentraciones encontradas en el presente estudio son menores a las reportadas para otras bacterias Gram negativas. Este efecto se podría asociar a los compuestos de cada EEP, y a las cantidades presentes en cada muestra (Tabla 6).^(46, 50)

Hay estudios que indican que el efecto de los EEP sobre bacterias Gram positivas es mayor; con concentraciones más bajas pueden alcanzar efecto bactericida. Kim y Chung en 2011, reportan una CMI de 2.3 mg/ml para *Staphylococcus aureus* y para *Bacillus cereus* 1.15 mg/ml. Ambas bacterias pueden aparecer como contaminantes en la comida enlatada.⁽⁵⁾

El trabajo más parecido al presente estudio es el realizado por Gutiérrez en 2011, en el cual se evaluaron cepas de *Pasteurella multocida* de origen cunícola frente a cinco propóleos mexicanos de diferentes regiones de la República Mexicana. En el presente estudio y el de Gutiérrez, se evaluaron EEP correspondientes al municipio de Cuautitlán Izcalli (FESC), en diferentes años. La CMI de 2011 se reporta de 0.3 mg/ml a 0.9 mg/ml. En este trabajo (2013), se obtuvieron CMI con un rango de 0.046 mg/ml hasta 1.5 mg/ml. La variación entre CMI probablemente resultó debido a que el propóleo, aunque es del mismo origen, se recolectó en fechas distintas, el origen de los aislamientos bacterianos es de especies diferentes y los EEP evaluados varían en cantidad y presencia de compuestos.

En relación al perfil químico de los propóleos estudiados, los componentes encontrados en las muestras del presente trabajo fueron: naringenina, pinocembrina y catequina. La pinocembrina fue el metabolito detectado en 4 de los 5 EEP. Este compuesto coincide con lo que encontraron Lotti y colaboradores en 2010, al evaluar una muestra de propóleo rojo mexicano de Sonora.^(6,51) Además Gutiérrez en 2011 reporta la presencia de pinocembrina, crisina y naringenina en el EEP de Cuautitlán Izcalli (Edo. de México); en este estudio, la crisina no está presente, lo que podría explicar que se hayan encontrado la variación en cuanto a los valores obtenidos en la CMI.⁽¹²⁾

La pinocembrina ha sido reportada en propóleos de Argentina, Italia y España como principal componente según Volpi y Berganzini en 2006.⁽⁵²⁾ Es uno de los principales flavonoides que se

encuentran en propóleos de diferentes lugares, sin embargo, aunque esté presente en su composición química, la actividad biológica de los propóleos, se ve afectada por de su lugar de origen, época de cosecha, o proporción de acuerdo con Martínez en 2010. ⁽⁵³⁾

Rodríguez en 2014, realizó un análisis mediante espectrometría de gases masas del EEP de Cuautitlán Izcalli empleado en este trabajo, fue recolectado en el 2013, obteniendo los siguientes compuestos: Palmitato de etilo, Éster etílico de ácido oleico, pinocembrina, tectocrisina y 1(3-aminopropil) azaciclotridecan-2-ona; de los cuales solo la pinocembrina coincide con los resultados del presente estudio. ⁽⁵⁴⁾

En cuanto a la sensibilidad a antibióticos, se encontró que todas las cepas bacterianas evaluadas muestran una resistencia al antibiótico empleado más común: la penicilina, así como a otros β lactámicos. Es un factor preocupante ya que en algunos estudios reportan que se han encontrado cepas de *P. multocida* multirresistentes a distintos antibióticos. En México, Pijoan y Aguilar en 1996 reportan cepas de *Pasteurella spp.* resistentes a kanamicina o lincomicina, así como penicilina y estreptomicina. ⁽⁵⁵⁾ Xibiao y colaboradores (2009) reportan cepas en China, que son resistentes a amoxicilina, lincomicina, clindamicina, clortetraciclina y tetraciclina. ⁽⁵⁶⁾ Aunque no se encontraron estudios más recientes en México, con estos dos estudios nos damos cuenta que las bacterias se han vuelto resistentes a distintos antibióticos a lo largo de los años. Si empleáramos el propóleo en los animales además de prevenir la pasteurelosis, podríamos observar efectos benéficos en los parámetros de producción, ya que se ha empleado como promotor de crecimiento en aves, cerdos y corderos. Además en pollos mejora la conversión alimenticia y previene trastornos digestivos. ⁽⁵⁷⁾ Otra bondad de este producto es, que por ser un producto natural las bacterias no han presentado resistencia (no se han encontrado reportes publicados que mencionen lo contrario).

Para confirmar la inhibición del crecimiento de las colonias, se implementó una curva de crecimiento, cada 3 horas se hicieron siembras para identificar el momento justo en el que el propóleo inhibiera el desarrollo, esto por un periodo de 24 horas.

En esta prueba el EEP inhibió el crecimiento de las colonias a partir de la primera siembra, es decir, desde la hora 3, respecto al cloranfenicol, éste inhibió hasta la tercera siembra (9 horas después) de iniciado el desafío por lo que tenemos que resaltar que una vez más se confirma la eficiencia del EEP.

A pesar de que muchos estudios se han centrado en demostrar la actividad antibacteriana del propóleo y de diversos extractos, existen pocos trabajos que han demostrado pocos sus efectos sobre la morfología y estructura bacteriana. ^(5,17)

Anteriormente, Londoño en 2010 reportó las alteraciones ultraestructurales de *Candida albicans* observadas por microscopía electrónica de barrido al ser tratadas con propóleo de FES Cuautitlán, señalando la presencia de cambios en la pared celular de las levaduras, con sitios de gemación irregulares, y perturbación de la división resultando en defectos en la textura de la pared de las células hijas. ⁽¹⁷⁾

Kim y Chung en 2011 evaluaron el efecto de propóleo coreano sobre *Bacillus cereus* y se reporta, que el daño sobre el bacilo se observó directamente sobre la pared celular, causando daño irreversible sobre estas estructuras. ⁽⁵⁾

En el presente trabajo, mediante micrografías electrónicas de transmisión de secciones ultrafinas de *Pasteurella multocida* tratadas con EPP, los hallazgos ultraestructurales revelaron, hay vacuolización dentro de las células, además de alteración y ruptura de las estructuras de la cubierta externa de la bacteria, con liberación de material intracelular, similares a las reportadas por los autores antes mencionados. Lo anterior nos permite dilucidar un aspecto siempre investigado, los posibles mecanismos de acción del propóleo. Sin embargo se necesitan más estudios para comprender la interacción de los componentes de este producto con las estructuras químicas que conforman tanto la pared y membrana celular para así tener una mayor comprensión del efecto antibacteriano.

CONCLUSIONES

El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad antimicrobiana de cinco propóleos mexicanos de diferente origen frente a aislamientos de *Pasteurella multocida* de origen porcino; así como observar los cambios en la estructura celular de la bacteria, producidos por el propóleo para tratar de fundamentar el posible uso del propóleo como tratamiento preventivo de las neumonías provocadas por este agente en cerdos.

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede concluir:

1. Se demostró la actividad anti bacteriana de los cinco EEP *in vitro* frente a los aislamientos de *Pasteurella multocida* proveniente de pulmones neumónicos de cerdo.
2. Se observó variabilidad de los compuestos detectados mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC).
3. De los propóleos estudiados, los principales metabolitos secundarios que se encontraron en los extractos etanólicos fueron pinocembrina, naringenina y catequina.
4. El EEP que tuvo una mejor actividad antimicrobiana proviene del municipio de Cuautitlán Izcalli, dado que se obtuvo una Concentración Bactericida Mínima de 0.37 mg/mL.
5. En la curva de crecimiento, se demostró que la bacteria no se desarrolló, ni al inicio ni durante las 24 horas que duró la prueba. Incluso durante las primeras horas de incubación con el tratamiento de EEP de Cuautitlán.

6. El daño que se observó mediante microscopía electrónica fue principalmente a nivel de pared celular de la bacteria, donde observamos discontinuidad de la estructura, provocando la salida de contenido intracelular.
7. Los resultados obtenidos pueden fundamentar el uso del propóleo para la prevención de neumonías en cerdos.

PERSPECTIVAS

Llevar a cabo pruebas *in vivo* bajo un modelo experimental en donde se desarrolle la pasteurelosis en cerdos y probar la actividad antibacteriana de propóleo en los animales en diferentes estadios de la enfermedad.

Lograr estandarizar una dosis terapéutica o implantar un protocolo de medicación en las diferentes etapas de producción. Como un profiláctico en los cambios de etapa, por ejemplo del destete al desarrollo, donde la flora propia conjugada con el estrés del cambio, puede hacer que ésta inicie un proceso patológico.

Anteceder con esto la elaboración de un producto cuyo principio activo sea el propóleo y que pueda administrarse libremente sin tener los efectos negativos de la medicación alópata (tiempo de retiro del medicamento antes de la comercialización de la carne, resistencia antimicrobiana). También encontrar la mejor vía de administración ya sea agua de bebida o como pro biótico en el alimento.

Ser uno de las medicaciones de elección en etapas agudas con diagnóstico temprano de la pasteurelosis porcina.

ANEXOS

Anexo 1. Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

La cromatografía es una técnica para separar mezclas en sus componentes individuales para que puedan ser identificados y cuantificados. En cromatografía líquida (LC), un líquido en movimiento (fase móvil) lleva la muestra a través de una fase estacionaria (el soporte sólido encontrado dentro de una columna de LC). Los componentes de la muestra se separan con base a la afinidad que presenten a la fase estacionaria. La LC es adecuada para el análisis de moléculas no volátiles y térmicamente sensibles, incluyendo compuestos de alto peso molecular como proteínas. Puede ser una herramienta útil para purificar moléculas pequeñas y macromoléculas derivadas de síntesis química o procesos naturales. ^(39, 58)

Los componentes básicos de un cromatógrafo de líquidos son:

- Dispositivo de suministro de eluyentes (bomba y dispositivo de mezclado de eluyentes)
- Dispositivo de inyección
- Conducciones y conexiones
- Detector y registrador
- Columna

En la figura 34 se muestran los componentes del cromatógrafo.

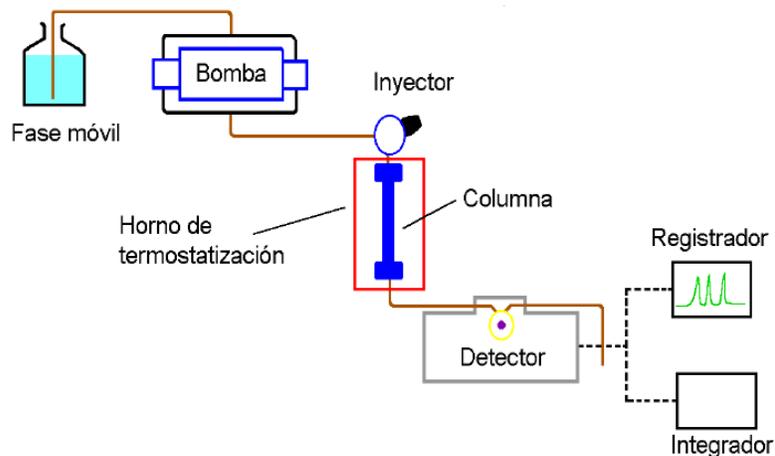


Fig. 34 Esquema de un cromatógrafo de líquidos.9 ⁽⁴¹⁾

Los métodos cromatográficos pueden informar el número de compuestos químicos presentes en una mezcla. Los resultados que se pueden obtener de manera cualitativa o cuantitativa. ⁽³⁸⁻³⁹⁾

Una vez que se procesa la muestra, los cromatógrafos arrojan resultados en una gráfica, conocida como cromatograma. ⁽³⁹⁾

Un ejemplo de un cromatograma de una mezcla evaluada mediante HPLC se muestra en la figura 7.

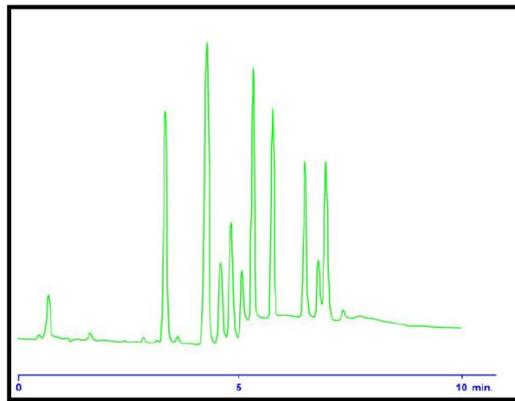


Fig. 35 Cromatograma típico de una mezcla ⁽³⁸⁾

Anexo 5. Cromatogramas obtenidos de los Extractos Etanólicos de Propóleo.

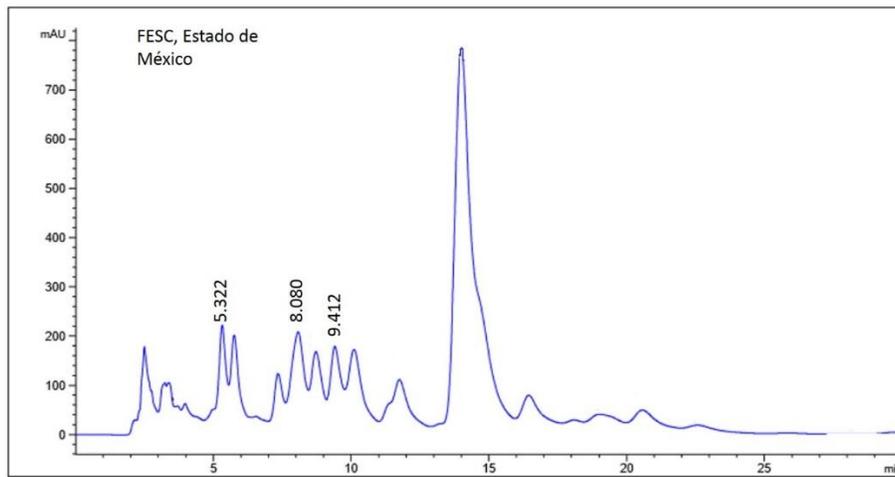


Figura 36. Cromatograma del extracto etanólico de Cautilán Izcalli (FESC) Pérez, 2013

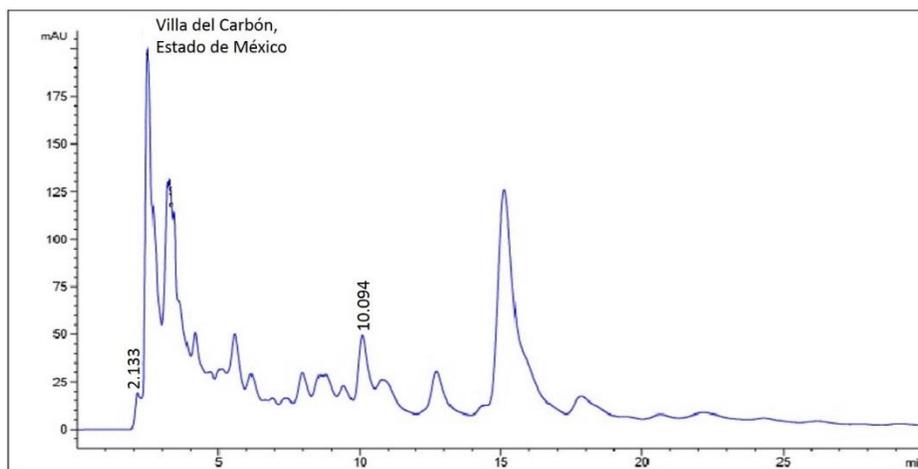


Fig. 37 Cromatograma del EEP de Villa del Carbón. Pérez, 2013

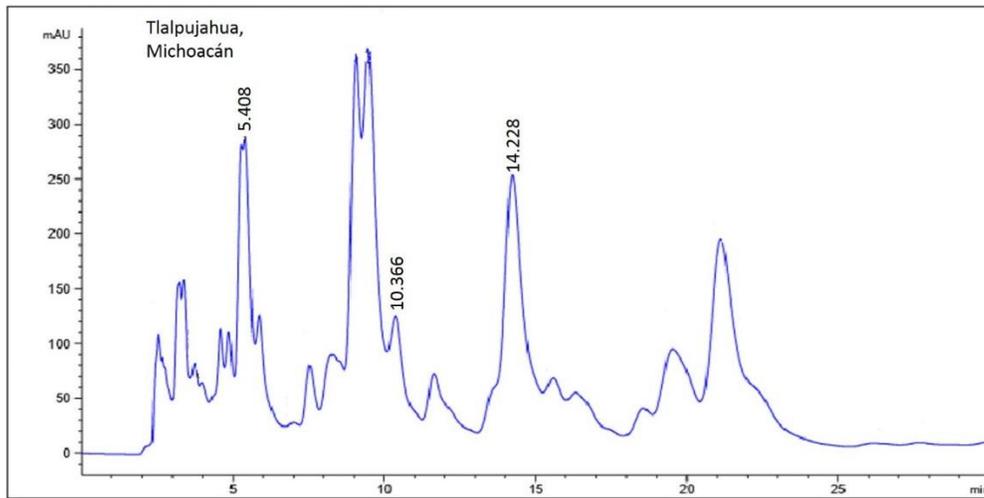


Fig. 38 Cromatograma del EEP de Talpujahuá, Michoacán. Pérez, 2013

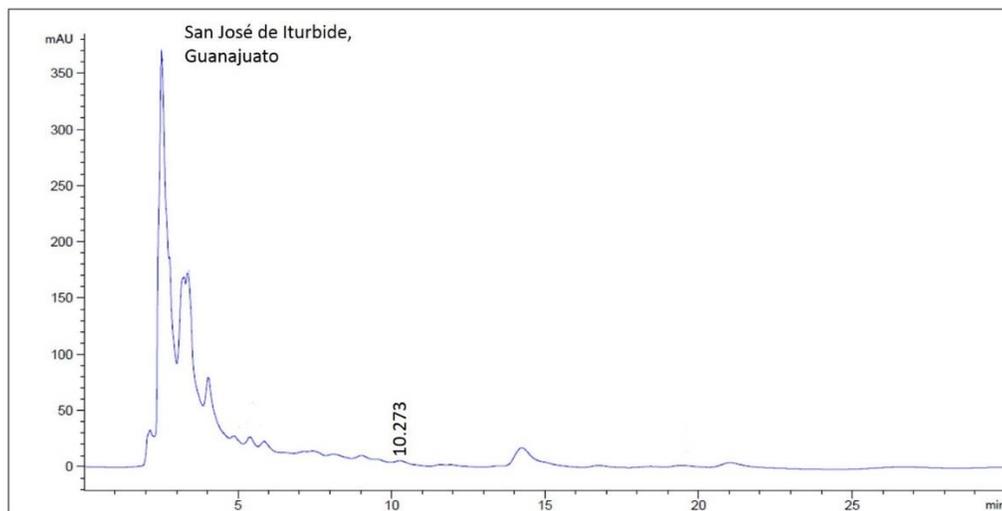


Fig. 39 Cromatograma del EEP de San José Iturbide Guanajuato. Pérez, 2013

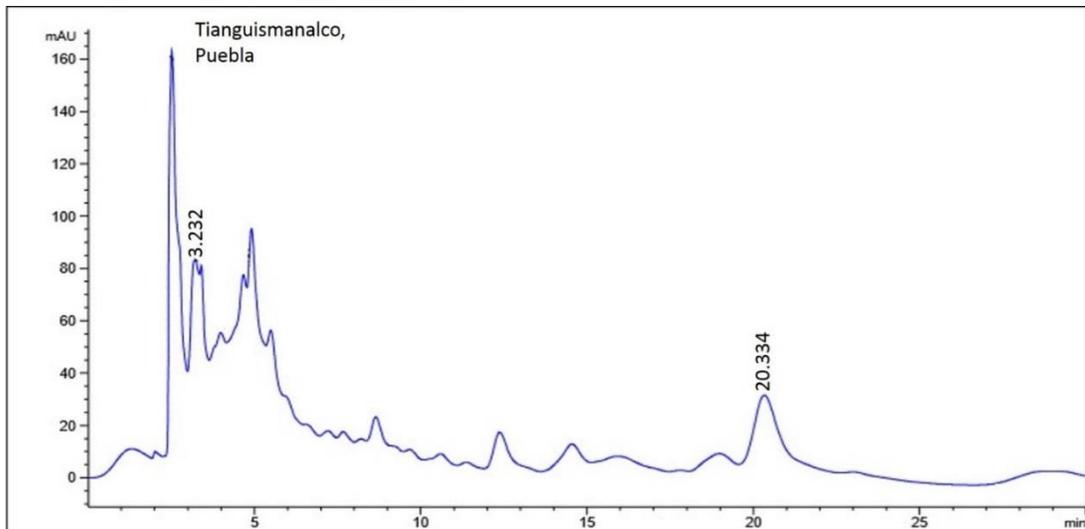


Fig. 40 Cromatograma del EEP de Tianguismanalco, Puebla. Pérez, 2013

Anexo 2. Microscopía electrónica ⁽⁴⁰⁻⁴¹⁾

La microscopía electrónica es una técnica empleada para el estudio y análisis de las características micro estructurales de objetos sólidos.

Existen dos tipos de microscopía: microscopía electrónica de transmisión (MET) y la microscopía electrónica de barrido (MEB).

En esta última, podemos observar muestras en tres dimensiones, en contraste con la MET, en donde las muestras son observadas en dos dimensiones.

En las siguientes fotografías de bacterias (figura 36) podemos observar la diferencia entre imágenes tomadas en un microscopio de barrido (A) y uno de transmisión (B).

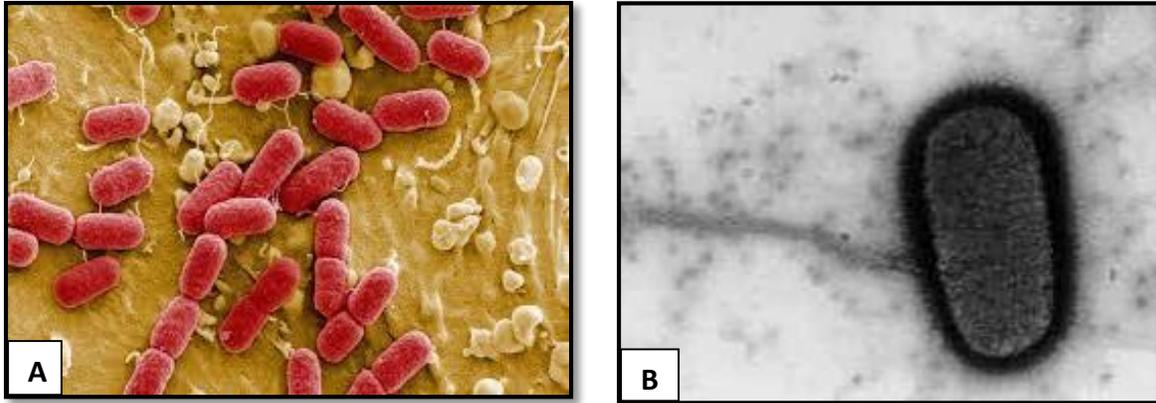


Fig. 41 Microscopía electrónica de barrido de *E. coli* (A) y Microscopía electrónica de transmisión (B). lavanguardia.com

En la MET el haz de electrones atraviesa el material que se desea observar. El modo de operar de este tipo de microscopio es similar al del microscopio óptico. El campo electromagnético actúa sobre un haz de electrones de una manera muy parecida a la acción de la lente de cristal sobre el haz de fotones. ⁽⁴⁰⁻⁴¹⁾

El haz de electrones pasa a través de unas lentes electromagnéticas que dan lugar a una imagen ampliada. Esta imagen pasa a su vez por una lente proyectora hasta una pantalla de material fluorescente, que brilla al recibir el impacto de los electrones. Debajo de la pantalla se sitúa la cámara para fotografiar la imagen. ⁽⁴⁰⁻⁴¹⁾

Las películas de muestra, además de ser delgadas, no deben poseer materiales que puedan dispersar o absorber electrones, deben ser lo suficientemente fuertes como para poderlas manipular, y lo bastante estables, como para no volatilizarse, a causa del bombardeo al vacío.

El interior del microscopio debe hallarse en vacío, ya que el aire impide la movilidad de los electrones, es por eso que se emplean las bombas de vacío.

Las técnicas que más se utilizan para este tipo de microscopio son: tinción negativa, la microtomía y la congelación.

La siguiente imagen muestra las diferencias en componentes entre un microscopio óptico y los microscopios electrónicos de transmisión y de barrido respectivamente.

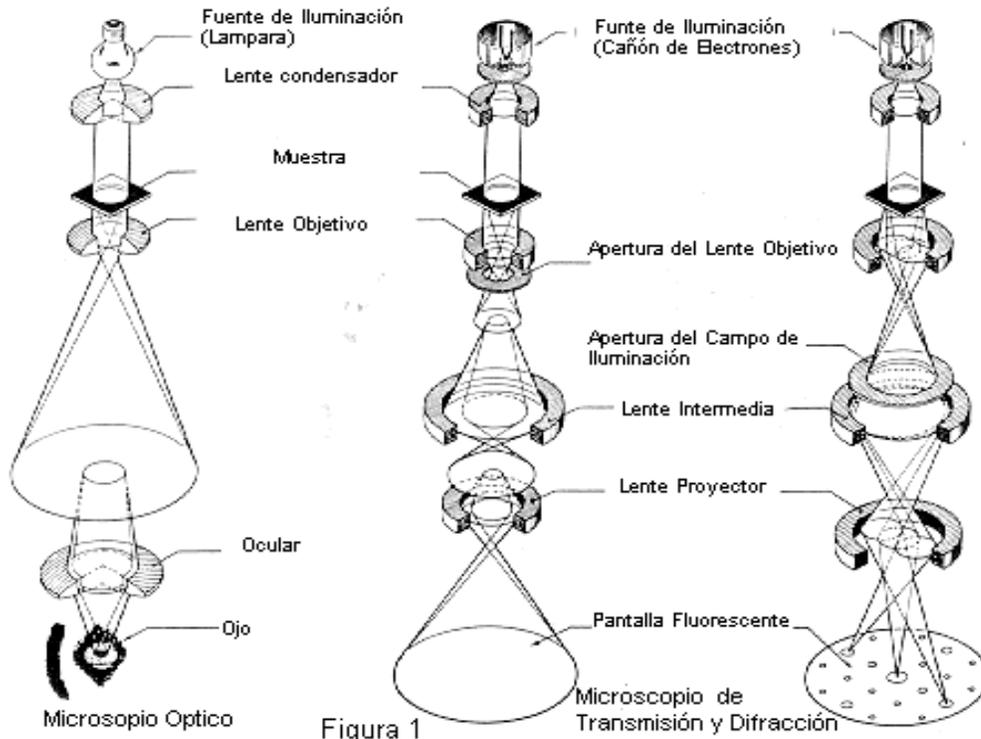


Fig. 42 Componentes de un microscopio óptico (izquierda), y microscopio electrónico de transmisión y difracción. ⁽⁴⁰⁾

Anexo 3. Microtécnica de dilución en caldo descrita por Konneman, 1985 ⁽³⁶⁾

La microdilución es una técnica basada en la actividad inhibitoria de los extractos o compuestos a evaluar. En esta técnica se interpreta el crecimiento bacteriano en los diferentes pozos por medio de un revelador.

Este revelador (cloruro de trifeníl-tetrazolium o TTC) se utiliza para detectar de manera indirecta la actividad respiratoria asociada a la cadena de transporte de electrones de los microorganismos. Las variaciones por unidad de tiempo en la actividad respiratoria pueden ser interpretadas como un reflejo de la actividad metabólica de los microorganismos que residen en determinado hábitat, en este caso, el caldo Müller Hinton con las diferentes concentraciones de los cinco EEP.

El TTC es utilizado debido a la rapidez con que los sistemas de deshidrogenasas la reducen. Al reducirse causan la formación de un precipitado insoluble de coloración rojo intenso conocido como formazán, que en esta prueba, indica la posible Concentración Mínima Inhibitoria de la bacteria.

A continuación se describe el procedimiento seguido para realizar la técnica:

1. Se colocan 50 μ l de caldo Müeller-Hinton (MH) en cada pozo de la placa.
2. Del stock de propóleo, se toman 500 μ l y se diluyen en 1 ml de caldo MH.
3. De esta solución (caldo MH-EEP), se toman 50 μ l de la solución y se coloca en el pozo #2.
4. Posteriormente, se toman 50 μ l de cada pozo, a partir del número 2 y se depositan en los pozos siguientes. Al llegar al último pozo, se desechan los últimos 50 μ l.
5. Después se inoculan todos los pozos de la placa con 50 μ l del cultivo de *P. multocida*.
6. Por último, las placas de ELISA se incuban 24 horas a 37°C en una estufa bacteriológica BINDER, SERIE BD 23.
7. Para leer los resultados 24 horas después, se preparan 2 ml de una solución de sal tetrazolio oxidada al 8%, y se agrega a todos los pozos de la placa. Se incuba 30 minutos más.

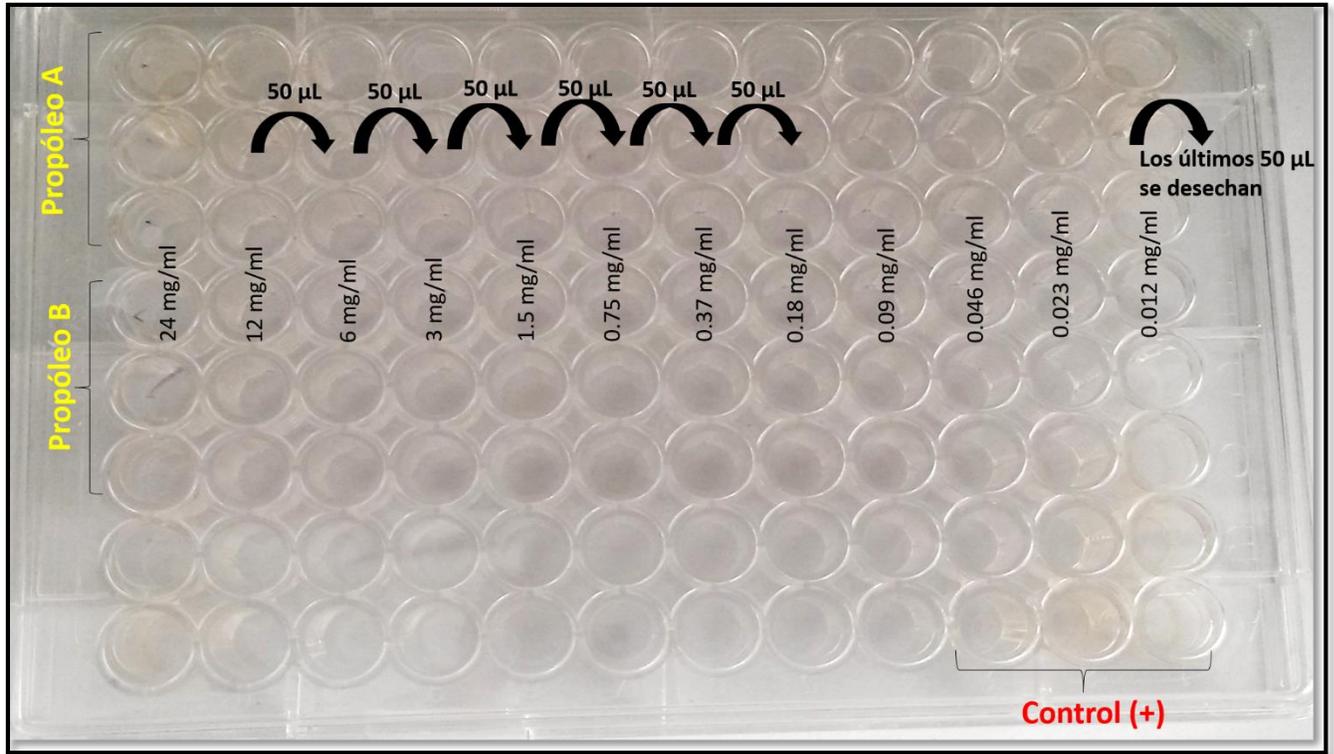


Fig. 43 Placa de Elisa. Pérez, 2014

Anexo 4. Técnica de difusión en agar de Kirby-Bauer ⁽³⁷⁾

El propósito de la prueba de difusión en agar de Kirby-Bauer es determinar la sensibilidad o resistencia de bacterias patógenas aerobias y anaerobias facultativas a varios componentes antimicrobianos, esto con el objetivo de tener opciones de tratamiento para los pacientes. El microorganismo patógeno crece sobre el agar Müeller Hinton en presencia de varios discos de papel filtro, impregnados de antibiótico. La presencia o ausencia de crecimiento alrededor de los discos es una medida indirecta de la habilidad de cada compuesto para inhibir ese organismo.

Preparación del inóculo

1. Utiliza un asa de inoculación estéril para tomar 4 a 5 colonias aisladas del microorganismo que será probado.
2. Suspende el organismo en 2 ml de solución salina estéril.
3. Agita el tubo con solución salina para crear una solución homogénea.

4. Ajusta la turbidez de la solución a la escala de 0.5 de McFarland. Añade más colonias si la suspensión no es tan turbia o diluye adicionando más solución salina estéril si es más turbia que la escala empleada.
5. Utiliza esa suspensión dentro de los primeros 15 minutos de preparación.

Inoculación de la placa de agar Müller Hinton

1. Introducir un hisopo estéril en el tubo del inóculo estandarizado.
2. Rotar el hisopo en las paredes del tubo para eliminar el exceso de líquido. El hisopo no debe derramar el exceso de medio líquido fuera del tubo.
3. Inocular sobre la superficie seca de la placa de agar MH, pasando tres veces el hisopo sobre toda la superficie del agar; gira la placa aproximadamente 60 grados para asegurar la distribución del inóculo sobre toda la superficie.
4. Rodear el borde del agar con el hisopo para que absorba el exceso de líquido.
5. Desechar el hisopo dentro de un contenedor apropiado.
6. Permitir que la placa repose a temperatura ambiente de 3 a 5 minutos para que la superficie del agar se seque antes de seguir con el siguiente paso.

Colocación del multidisco

1. Colocar los discos impregnados de antibiótico sobre la superficie del agar.
2. Una vez que los discos están en su lugar, colocar la tapa sobre la caja de Petri e incubar a 35° por 18 a 24 horas.
3. Posteriormente se realiza la medición de los halos de inhibición que se observen en cada disco.

BIBLIOGRAFÍA (orden de aparición)

1. Bedascarrsbure E. Propóleos. Caracterización y normalización de propóleos argentinos. Revisión y actualización de composición y propiedades. Ediciones MAGNA, Tucumán, Argentina. Julio de 2006.
2. Takaisi - Kikuni NB. Schilcher H. "Electron microscopic and microcalorimetric investigations of the possible *mechanism* of the antibacterial action of a defined propolis provenance". *Planta Medica*. 1994; 60(3):222-7.
3. Cañizares E., Tolosa L. Obtención, caracterización y evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos de Campeche. *Ars Pharmaceutica*, 43:1-2; 43:1-2; 187-204, 2002.
4. Cañizares E., Tolosa L. Obtención, caracterización y evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos de Campeche. *Ars Pharmaceutica*, 43:1-2; 43:1-2; 187-204, 2002.
5. Ha Kim- Youn y Jung chung Hyun, The effect of Korean propolis against foodborne pathogens and transmission electron microscopic examination. Departamento de Comida y Nutrición, Universidad de Inha, Incheon, Republica de Korea. *New Biotechnology*, Volume 28, Number 6, Octubre 2011.
6. Lotti C, Campo FM, Lisa PA, Cuesta RO, Márquez HI, Rastrelli L. Chemical constituents of red mexican propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry Article*. 2010, 58. 2209-2213. DOI: 10.1021/jf100070w
7. Cartaya O, Reynaldo Inés. "Flavonoides:Características químicas y aplicaciones". *Cultivos tropicales*, 2001, vol. 22, no. 2, p.5-14.
8. Petruška P., Tušimová E., Kalafová A., Haščík P., Kolesárová A., Capcarová M. "Effect of propolis in chicken diet on selected parameters of mineral profile." *Journal of Microbiology, Biotechnology Food Sciences*, 2012: 1 (4) 593-600.
9. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. <http://www.gob.mx/siap/>
10. Sepúlveda J. G., Porta, D. H., Rocha S. M., "La participación de los metabolitos secundarios en la Defensa de las Plantas". *Revista Mexicana de Fitopatología*, vol. 21, num.3, diciembre, 2003. pp. 355-363, Sociedad Mexicana de Fitopatología, A. C. Texcoco, México.

11. Fischer G., Niraldo P., Marcucci MC, Siedler BS, Munhoz LS, Finger PF, Vargas GD, Hübner SO, Vidor T., Roehe PM. "Green propolis phenolic compounds act as vaccine adjuvants, improving humoral and cellular responses in mice inoculated with inactivated vaccines". Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 105(7): 908-913, November 2010
12. Gutiérrez H. E. Actividad antibacteriana y perfil químico de propóleos mexicanos sobre cepas de *Pasteurella multocida* aisladas de conejos. Tesis de Maestría en Ciencias. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Cuautitlán Izcalli. 2011
13. Rasul, F. Millimouno, W. Eltayb, M. Ali, J. Li, X. Li, "Pinocembrin: A novel natural compound with versatile pharmacological and biological activities", Hindawi Publishing Corporation, BioMed Research International, Volume 2013.
14. Sforcin J. M. "Propolis and the immune system: a review". Elsevier Ireland Ltd. Accepted May 2007. DOI: 10.1016/j.jep.2007.05.012
15. Fierro MW, "Evidencia Científica del propóleos desde el punto de vista médico", 2000.
16. Havsteen BH. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. 2002 Elsevier Science Inc. All rights reserved. PII: S0163-7258(02)00298-X
17. Londoño OA, "Estudio comparativo de la actividad antifúngica de un extracto de propóleo mexicano y de tres plantas que *Apis mellifera* usa para su producción." Tesis doctoral. Cuautitlán Izcalli, Estado de México, 2010.
18. Cabello V. M. A. y Torres G. E. Panorama Agroalimentario. Dirección de análisis Económico y Consultoría. Fideicomisos Instituidos en Relación con la Agricultura. Dirección de Análisis Económico y Consultoría. 31 de noviembre de 2010.
19. Williams J. J. Torres L. M. Sansor N. R. "Prevalencia, caracterización y extensión de las lesiones en pulmones sacrificados en el rastro de Mérida, Yucatán, México". Rev Biomed 2000; Vol. 11, No. 1:25-32
20. García BN, "Caracterización fenotípica y genética de aislados de *Pasteurella multocida* obtenidos de ganado porcino". Tesis doctoral. Facultad de Veterinaria, Departamento de Salud Animal, Universidad Complutense de Madrid. España 2009.

21. González F. J., López S. A., Sánchez S. J. J., Toledo C. M. "Procesos respiratorios en ganado porcino (I)". Revista Anaporc, Noviembre 2011. (<http://www.archivo-anaporc.com/2011/11/09/procesos-respiratorios-en-ganado-porcino-i/>)
22. Espinosa I, Martínwz S. "*Pasteurella multocida*, *Bordetella bronchiseptica* y *Streptococcus suis* en el complejo respiratorio porcino". *Rev Salud Anim.* [online]. 2008, vol.30, n.3 [citado 2016-07-22], pp. 137-145. Disponible en: <http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0253-570X2008000300001&lng=es&nrm=iso>. ISSN 0253-570X.
23. González F. J., López S. A., Sánchez S. J. J., Toledo C. M. "Procesos respiratorios en ganado porcino (II)". Revista Anaporc, Diciembre 2011. (<http://www.archivo-anaporc.com/2011/12/23/procesos-respiratorios-en-ganado-porcino-ii/>)
24. Rinitis atrófica progresiva, rinitis atrófica no progresiva, pasterelosis neumónica. http://www.uco.es/dptos/sanidad-animal/img/infecciosas/Rinitis_Atrofica_05.pdf, consultada en junio 2013.
25. <http://albeitar.portalveterinaria.com/noticia/9478/articulos-porcino-archivo/modelos-neumonicos-y-complejo-respiratorio-porcino-en-imagenes.html> 18 de febrero 2013.
26. De Cueto M, Pascual A. *Pasteurella multocida*, Departamento de Microbiología, Hospital Universitario Virgen Macarena, Sevilla. Consultado en junio 2013. <http://www.seimc.org/control/revisiones/bacteriologia/pmultocida.pdf>
27. Williams J, Salazar FM, Ramírez PR, Mosqueda AZ. Sensibilidad *in vitro* de cepas de *Actinobacillus pleuropneumoniae* y *Pasteurella multocida* tipo "A" ante diferentes antimicrobianos. *Rev Biomed* 2001; No. 3, Vol. 12: 172-179. <http://www.uady.mx/~biomedic/rb011234.pdf>
28. Portis E, Lindeman C, Johansen L, *et. al.* Antimicrobial susceptibility of porcine *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, and *Actinobacillus pleuropneumoniae* from the United States and Canada, 2001 to 2010. *J. Swine Health Prod.* 2013.
29. Astani A, Zimmermann S, Hassan E, Reichling J, Sensch KH, Schnitzler P. Antimicrobial activity of propolis special extract GH 2002 against multidrug-resistant clinical isolates. *Feld* 324, 69120. *Pharmazie* 68: 695–701 (2013) doi: 10.1691/ph.2013.2907

30. Jackson P. G. G. Cockcroft P. D. Manual de Medicina Porcina. Ed. Intermédica, Argentina 2009
31. Bogdanov S. Propolis: Composition, Health, Medicine: A Review, <http://www.bee-hexagon.net/files/fileE/Health/PropolisBookReview.pdf>.
32. Dimov V, Ivanovska N, Bankova V, Popov S. Immunomodulatory action of propolis: IV. Prophylactic activity against Gram-negative infections and adjuvant effect of the water-soluble derivative. Vaccine, Vol. 10, Issue 12, 1992.
33. Ivanovska ND, Dimov BV, Bankova VS, Popov SS. Immunomodulatory action of propolis. VI. Influence of a water-soluble derivative on complement activity in vivo. 1995 Elsevier Science Ireland Ltd. *SSDI* 0378-8741(95)01272-F
34. Vincent L. B. "The impact of oxutetracycline dosing on bacterial populations and transfer of resistance elements *in vitro* and *in vivo*. University of Kansas, 2009.
35. Cowan and Steels. Manual for the Identification of Medical Bacteria. 2003, (3° ed). Cambridge United Kingdom (Eds.), pp. 117-120.
36. Koneman, E. W., Allen, S. D., Dowell, V. R. y Sommers, H. M. (1985). Diagnóstico microbiológico. Ed. Médica Panamericana, México. 909 pp.
37. Maye B. R., Gúzman M. U. El antibiograma de discos. Técnica de Kirby-Bauer. Blomedica vol. 4, no. 3 y 4 – 1984. www.revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/download/1891/1917
38. Conceptos fundamentales de cromatografía, http://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES/investigacion/cromatografia/principios_de_cromatografia.pdf
39. Guía de cromatografía. Caracas 2008. <http://www.ciens.ucv.ve:8080/generador/sites/LIApregrado/archivos/Guia%20para%20cromatografia.pdf> Martínez Telmo, Figueroa Judith, Martínez Nhora. "Evaluación del rendimiento, en extracto blando, de muestras de propóleo colombiano tratadas con alcohol etílico en dos concentraciones de solvente: al 70% y 96%". <http://apiarioloscitricos.com/pdf/EN%20DOS%20CONCENTRACIONES%20DE%20SOLVENTE%20para%20enviar%20w97.pdf>

40. Apuntes de Microscopía Electrónica. Universidad Autónoma Metropolitana.
<http://www.uprm.edu/biology/profs/massol/manual/p4-actividadmicro.pdf>
41. Apuntes de microscopía electrónica.
<http://www.microscopiaelectronicauami.com/apuntes>
42. Gomes Dierckx SMA e Cunha Funari SR, “Uso da própolis na alimentação de leitões desmamados como aditivo e na prevenção à diarreia”, Departamento de Produção e Exploração Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - UNESP Botucatu – SP, Brasil. Arch. Latinoam. Prod. Anim. 7(2):109-116(1999).
43. Kabala DA, *et al.* “Comparative studies on the antimicrobial activity of propolis balm and silver sulphadiazine applied to burn wounds in pigs”. Bull. Vet. Inst, Pulawy 47. 541-545, 2003.
44. Dimov V, Ivanovska N, Bankova V, Popov S. Immunomodulatory action of propolis: IV. Prophylactic activity against Gram-negative infections and adjuvant effect of the water-soluble derivative. Vaccine, Vol. 10, Issue 12, 1992.
45. Dimov V, Ivanovska N, Bankova V, Popov S. Immunomodulatory action of propolis: IV. Prophylactic activity against Gram-negative infections and adjuvant effect of the water-soluble derivative. Vaccine, Vol. 10, Issue 12, 1992.
46. Kumungiev A, Tsvetkova I, Serkedjiev Y, Bankova V, Christov R, Popov S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. Journal of Ethnopharmacology 64 (1999) 235 -240. PII: S0378-8741(98) 00131 – 7.
47. Muñoz RL, Linares VS, Narváez SW. “Propiedades del propóleo como aditivo natural funcional en la nutrición animal”. Biosalud, Volumen 10 No. 2, julio – diciembre, 2011. Págs. 101 – 111. ISSN 1657-9550.
48. Noriega SV, “El propóleo, otro recurso terapéutico en la práctica clínica”, Curso de adaptación al grado. Departamento de enfermería E. U. E. “Casa salud Valdecilla”. Universidad de Cantabria, Septiembre 2014.
49. Uczay J., Lazzari R., Pianesso D., Adorian TJ, Mombach PI, Decarli JA. “Evaluación del propóleo como promotor de crecimiento en la carpa común (cyprinus carpio)”. Revista Científica, FCV-LUZ / Vol. XXI, Nº 5, 408 - 413, 2011.

50. Tolosa L. Obtención, caracterización y evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos de Campeche., E. Ars Pharmaceutica, 43:1-2; 187-204, 2002.
51. Valencia D, Alday E, Robles ZR, Garibay EA, Galvez RJ, Salas RM, Jiménez EM, Velazquez CE, Hernandez J. Seasonal effect on chemical composition and biological activities of Sonoran propolis. 2011 Elsevier Ltd. Doi: 10.1016/j.foodchem.2011.08.086
52. Volpi N., Bergonzini G. Analysis of flavonoids from propolis by on-line HPLC–electrospray mass spectrometry. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 42 (2006) 354–361. doi:10.1016/j.jpba.2006.04.017
53. Martínez L., Rojas N., Zetina T., R., Casillas P., R. El propóleo oscuro del estado de Campeche, XXIV Seminario de Apicultura. Cuernavaca, Morelos, Julio de 2010.
54. Rodríguez Pérez Betsabé, Perfil Químico de Propóleos Mexicanos ára su aplicación en Medicina Veterinaria. Tesis de Maestría en Ciencias de la Producción y Salud Animal. UNAM. Cuautitlán Izcalli, Edo. de México, 2015
55. Pijoan A. P., Aguilar R. F. Resistencia y sensibilidad a antimicrobianos en cepas de *Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella multocida* y *Haemophilus somnus*, aisladas en becerraslecheras en establos de Tijuana. Veterinaria México 31 (2), 2000. pp.153-156 <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/revvetmex/a2000/rvmv31n2/rvm31211.pdf>
56. Xibiao T., Qigai C. H., Zhao Z., Hu J., Wu B., Isolation, Antimicrobial Resistance, and Virulence Genes of *Pasteurella multocida* Strains from Swine in China. Journal of Clinical Microbiology. Apr. 2009, p. 951–958 Vol. 47, No. 4. 0095-1137/09/\$08.00_0 doi:10.1128/JCM.02029-08
57. Muñoz RL, Linares VS, Narváez SW. “Propiedades del propóleo como aditivo natural funcional en la nutrición animal”. Biosalud, Volumen 10 No. 2, julio – diciembre, 2011. Págs. 101 – 111. ISSN 1657-9550.
58. Guía de cromatografía. Caracas 2008. <http://www.ciens.ucv.ve:8080/generador/sites/LIApregrado/archivos/Guia%20para%20cromatografia.pdf>