



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN

**“EFECTO INHIBITORIO DEL EXTRACTO DE PROPOLEO  
SOBRE *Nocardia asteroides*, AISLADA DE  
VACAS CON MASTITIS”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACEÚTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A:

CORTÉS JUÁREZ ALEJANDRO

ASESORES: M.V.Z GERARDO CRUZ JÍMENEZ  
M.V.Z. JOSE ANTONIO LICEA VEGA  
M. en C. SOFIA GONZÁLEZ GALLARDO

CUAUTILÁN IZCALLÍ, ESTADO DE MÉXICO 2008



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.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLAN



DRA. SUEMI RODRIGUEZ ROMO  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN  
PRESENTE

DEPARTAMENTO DE  
EXAMENES PROFESIONALES  
ATN: L. A. ARACELI HERRERA HERNANDEZ  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos  
comunicar a usted que revisamos la Tesis :

Efecto inhibitorio del Extracto de Propóleo sobre Nocardia asteroides,  
aislada de vacas con mastitis.

que presenta el pasante: Alejandro Cortés Juárez  
con número de cuenta: 40203513-6 para obtener el título de :  
Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en  
el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 26 de Agosto de 2008

PRESIDENTE	MVZ. Gerardo Cruz Jiménez	
VOCAL	MC. Sofia González Gallardo	
SECRETARIO	QFB. Brígida del Carmen Camacho Enriquez	
PRIMER SUPLENTE	MC. Ma. Guadalupe Avilés Robles	
SEGUNDO SUPLENTE	QFB. Guadalupe Hernández Torres	

## **AGRADECIMIENTOS.**

*A DIOS por darme salud y el valor para enfrentar día a día mis problemas y por permitir que estén a mi lado todas aquellas personas que más amo.*

*A la FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN UNAM, por el privilegio de haber pertenecido a esta grandiosa Institución.*

*A mi mamá: MARCELYNA JUÁREZ SANDOVAL y mi papá: FRANCISCO CORTÉS LOZANO, por apoyarme en mis estudios, y sobre todo por lo mas importante que me han obsequiado, el regalo mas grande de el mundo: "LA VIDA"*

*A mi hermano JORGE CRUZ, a pesar de nuestras diferencias, gracias por todo tu apoyo.*

*Al profesor GERARDO CRUZ y ANTONIO LICEA por darme la oportunidad de realizar mi tesis con ustedes.*

*A la profesora SOFÍA GONZÁLEZ GALLARDO, por su orientación, motivación, consejos y por dedicar su tiempo en la revisión de mi tesis.*

*A mi hermano del alma, el mas claro ejemplo de superación ALBERTO RAMÍREZ RAMÍREZ, gracias "mi chavo" sin tu apoyo este trabajo no se hubiera concluido.*

*A todos los que integramos el laboratorio número 10 de microbiología de la Unidad de Posgrado: la señora Erika, Mony, Rosita, Ivonne, Alejandra, Rubén, Pablo, Diana, Gaby, Verónica, Lourdes y en especial a ULISES por su valiosa ayuda en el laboratorio y su amistad.*

*A todas aquellas personas que me apoyaron para la realización de este proyecto: a Mónica, Claus, Don Martintirilín, Omar, Erik,*

*A mis amigos y compañeros de la FESC C-1, Rosario, Orquídea, Verito, Nancy, Jessica Alejandra, Chío, Carol, Yadira, Giovanna, Dulce, Juan Carlos, Juan y a todos los demás, por su amistad desinteresada y por todos los momentos que hemos vivido juntos.*

*A mis primos: Ana Laura, Gustavo, Armando, Imelda y a todos mis tíos por su apoyo y motivación, quiero compartir con ustedes mis logros.*

**DEDICO ESTE TRABAJO:**

*A mi papá y mi mamá, por todo el sacrificio y esfuerzo que han hecho por mí.*

*A los hermanos que me hubiera gustado tener. A la banda de "la dona glaseada": Jorge Iván, Ulises, Gabriel, Ernesto, Paolina, Eli, Laurita, Miriam. Gracias por su amistad, espero que siempre estemos unidos.*

*A JULY por todo el apoyo incondicional y todo su cariño que se refleja en una gran amistad, al igual que YOLITA, por escucharme, por brindarme tu tiempo, palabras y consejos siempre de aliento.*

*A MARA ELIDA por no dejarme solo en estos momentos, gracias por tu apoyo y comprensión.*

*A KARINA CHÁVEZ ARELLANO por ser mi amiga y por compartir juntos malos ratos y buenos momentos, tristezas, alegrías y sonrisas ya que son los recuerdos que tienen un significado muy especial para mí.*

*A una de las personas que más amo: BELEM GUZMAN ORTEGA por darme los momentos más felices de mi vida, por todo el apoyo y todo tu amor, por estar conmigo siempre en las buenas y en las malas, por compartir conmigo todo lo que tu tienes, quiero ser mejor día a día para que te sientas muy orgullosa de mí como yo lo estoy de ti.*

## INDICE

Contenido	Pág.
Lista de abreviaturas.....	IV
Índice de tablas.....	V
Índice imágenes.....	V
Índice de figuras.....	VI
Índice de gráficos.....	VI
Índice de esquemas.....	VI
Resumen.....	VII
<b>1. INTRODUCCION.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Importancia de la leche en la industria.....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Problemas que inciden en la producción de leche.....</b>	<b>3</b>
1.2.1 Incidencias relacionadas con el parto.....	4
1.2.2 Enfermedades de la ubre.....	6
1.2.2.1 Edema mamario.....	6
1.2.2.2 Traumatismos.....	6
1.2.2.3 Evacuación de sangre por los pezones.....	6
1.2.2.4 Hipogalactia.....	6
1.2.2.5 Retención de la leche.....	7
1.2.2.6 Exantemas medicamentosos y de origen alimenticio.....	7
1.2.2.7 Verrugas.....	8
1.2.2.8 Viruela mamaria.....	8
1.2.2.9 Glosopeda.....	8
1.2.3 Problemática mundial de los residuos de plaguicidas.....	8
1.2.4 Efectos adversos de los residuos de antibióticos en la leche...	8
<b>1.3 Mastitis.....</b>	<b>12</b>
1.3.1 Mastitis subclínica.....	13
1.3.2 Mastitis clínica.....	14
1.3.3 Mastitis clínica subaguda.....	14
1.3.4 Mastitis clínica aguda.....	14
1.3.5 Mastitis aguda con signos sistemáticos.....	14
1.3.6 Mastitis crónica.....	14
1.3.7 Mastitis por bacterias contagiosas.....	15
1.3.8 Mastitis por bacterias ambientales.....	15
<b>1.4 Nocardia asteroides.....</b>	<b>19</b>
1.4.1 Generalidades.....	19

1.4.2 Morfología e Identificación.....	20
1.4.3 Enfermedades en diversas especies animales.....	22
1.4.4 Patogénesis y datos clínicos.....	23
1.4.5 Formas clínicas.....	23
1.4.6 Pruebas diagnósticas de Laboratorio.....	24
1.4.7 Tratamiento.....	25
1.4.8 Diagnóstico de la mastitis.....	25
1.4.9 Pruebas de establo.....	26
<b>1.5 Propoleo.....</b>	<b>31</b>
1.5.1 Antecedentes.....	31
1.5.2 Origen.....	31
1.5.3 Composición.....	32
1.5.4 Propiedades.....	33
1.5.5 Mecanismo de acción.....	34
<b>1.6 Justificación.....</b>	<b>37</b>
<b>1.7 Hipótesis.....</b>	<b>38</b>
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>39</b>
2.1 Objetivos generales.....	39
2.1.2 Objetivos particulares.....	39
<b>3. Material y equipo de laboratorio.....</b>	<b>40</b>
<b>4. Diagrama de trabajo.....</b>	<b>42</b>
<b>5. Metodología.....</b>	<b>43</b>
5.1 Obtención del Propoleo.....	43
5.1.1 Extracción del Propoleo.....	43
5.1.2 Aislamiento de <i>Nocardia asteroides</i> .....	44
5.1.3 Técnica cualitativa cilindro placa (Propoleo).....	44
5.3 Técnica cualitativa cilindro placa (DMSO).....	46
5.4 Ensayo extracto-bacteria.....	46
5.4.1 Método colorimétrico de Moosman.....	49
5.4.2 Ensayo bactericida-bacteriostático.....	50
5.5 Microscopía Electrónica de Transmisión.....	50
5.5.1 Preparación de las rejillas con membranas fomvar.....	51
5.5.2 Técnica de Tinción negativa.....	52
<b>6. Resultados.....</b>	<b>54</b>
6.1 Efecto del extracto de Propoleo en <i>Nocardia asteroides</i> método cilindro-placa.....	54
6.2 Efecto del DMSO en <i>Nocardia asteroides</i> método cilindro-placa.....	55

6.1.3 Gráfica 1. Determinación de la MIC del EP a diferentes concentraciones en <i>Nocardia asteroides</i> cepa 1, aislada de leche de vacas con mastitis.....	58
6.1.4 Gráfica 2 Determinación de la MIC del EP a diferentes concentraciones en <i>Nocardia asteroides</i> cepa 2, aislada de leche de vacas con mastitis.....	59
6.1.5 Gráfica 3. Determinación de la MIC del EP a diferentes concentraciones en <i>Nocardia asteroides</i> cepa 3, aislada de leche de vacas con mastitis.....	60
6.1.6 Gráfica 4. Determinación de la MIC del EP a diferentes concentraciones en <i>Nocardia asteroides</i> cepa 4, aislada de leche de vacas con mastitis.....	61
6.1.7 Gráfica 5. Determinación de la MIC del EP a diferentes concentraciones en <i>Nocardia asteroides</i> cepa 5, aislada de leche de vacas con mastitis.....	62
6.1.8 Gráfica 6. Determinación de la MIC del EP a diferentes concentraciones en <i>Nocardia asteroides</i> cepa 6, aislada de leche de vacas con mastitis.....	63
6.1.9 Gráfica 7. Determinación de la MIC del EP a diferentes concentraciones en <i>Nocardia asteroides</i> cepa 7, aislada de leche de vacas con mastitis.....	64
6.1.10 Gráfica 8. Determinación de la MIC del EP a diferentes concentraciones en <i>Nocardia asteroides</i> cepa 8, aislada de leche de vacas con mastitis.....	65
6.2 Efecto bactericida, bacteriostático en <i>Nocardia asteroides</i> .....	66
6.3 Fotografías de Microscopia Electrónica de transmisión.....	68
<b>7. Discusión de Resultados.....</b>	<b>70</b>
<b>8. Conclusiones.....</b>	<b>82</b>
<b>9. Sugerencias.....</b>	<b>83</b>
<b>10. Apéndice.....</b>	<b>84</b>
10.1 Análisis estadístico, Comparación por Parejas.....	84
10.2 Preparación de reactivos.....	87
<b>11. Referencia bibliográfica.....</b>	<b>88</b>



## LISTA DE ABREVIATURAS

Abs	Absorbancia
DMSO	Dimetilsulfóxido
mg/ml	Miligramos por mililitro
µg/µl	Microgramos por microlitro
EEP	Extracto Etanólico de Propoleo
EP	Extracto de Propoleo
rpm	Revoluciones por minuto
°C	Grados centígrados
g	Gramos
ml	Mililitros.
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
CMB	Concentración Mínima Bactericida
MET	Microscopía Electrónica de Transmisión.
MTT	(3-[4,5-dimetiltiazol-111]-2,5-difeniltetrazolio)
nm	Nanómetros
RFM	Membrana fetal retenida
CMT	Prueba para mastitis de California

## INDICE DE TABLAS

	<b>Pág</b>
1. Trastornos relacionados con el parto.....	4
2. Bacterias causantes de la mastitis.....	15
3. Bacterias contagiosas.....	16
4. Bacterias ambientales.....	17
5. Pruebas bioquímicas.....	22
6. Animales domésticos hospederos.....	22
7. Compuestos con actividad biológica encontrados en diferentes propóleos.....	34
8. Técnica cilindro-placa (EP).....	45
9. Técnica cilindro-placa (DMSO).....	46
10. Preparación de controles y problemas. Ensayo Extracto-Bacteria.....	47
11. Preparación para controles y problemas de la MET.....	50
12. Promedio de absorvancias a 575 nm.....	57

## ÍNDICE DE IMAGENES

1. Ubre con mastitis.....	12
2. Componentes de la pared celular de <i>Nocardia asteroides</i> .....	20
3. Tinción de Gram., bacilo Gram. +, visto con el aumento de 100 x.....	21
4. Primera ordeña de la mañana.....	26
5. Examen físico de la ubre.....	27
6. Prueba de la conductividad.....	28
7. Reacción ácida, presencia de microorganismos patógenos.....	29
8. Prueba de Mastitis de California.....	30
9. Recolecta de polen y otras sustancias por <i>Apis mellifera</i> .....	31
10. <i>Apis Mellifera</i> secretando propoleo.....	31
11. Propoleo, extracto crudo.....	32
12. Compuestos fenólicos de acción farmacológica obtenidos a partir de propoleo.....	33
13. Microplaca de 96 pozos donde se realizó el ensayo Extracto-Bacteria.....	49
14. Técnica de penicilindros, DMSO no presenta ninguna actividad en <i>Nocardia asteroides</i> .....	54

15. Técnica de penicilindros, inhibición de <i>Nocardia asteroides</i> por el EP.....	55
16. Técnica de microdilución en Caldo.....	56
17. Efecto Bactericida-Bacteriostático del EP en <i>Nocardia asteroides</i> .....	66
18. Microscopia Electrónica de Transmisión, fotografías de <i>Nocardia asteroides</i> a 15 000 aumentos.....	68

#### **INDICE DE FIGURAS**

1. Sistema de diluciones dobles.....	48
2. Técnica de Tinción Negativa.....	53

#### **ÍNDICE DE GRAFICAS**

1. Determinación de la MIC a diferentes concentraciones del EP sobre <i>Nocardia asteroides</i> , cepa 1.....	58
2. Determinación de la MIC a diferentes concentraciones del EP sobre <i>Nocardia asteroides</i> , cepa 2.....	59
3. Determinación de la MIC a diferentes concentraciones del EP sobre <i>Nocardia asteroides</i> , cepa 3.....	60
4. Determinación de la MIC a diferentes concentraciones del EP sobre <i>Nocardia asteroides</i> , cepa 4.....	61
5. Determinación de la MIC a diferentes concentraciones del EP sobre <i>Nocardia asteroides</i> , cepa 5.....	62
6. Determinación de la MIC a diferentes concentraciones del EP sobre <i>Nocardia asteroides</i> , cepa 6.....	63
7. Determinación de la MIC a diferentes concentraciones del EP sobre <i>Nocardia asteroides</i> , cepa 7.....	64
8. Determinación de la MIC a diferentes concentraciones del EP sobre <i>Nocardia asteroides</i> , cepa 8.....	65

#### **INDICE DE ESQUEMAS**

1. Sembrado masivo en BHI.....	45
2. Técnica de Tinción negativa.....	53

## 1. INTRODUCCIÓN.

### 1.1 Importancia de la leche en la industria

Desde la introducción de los primeros bovinos en el siglo XVI por los españoles hasta fines del siglo XIX, la ganadería se desarrolla fundamentalmente en las haciendas destinadas a la producción de carne y leche para el consumo interno. A principios del siglo XX, debido a la necesidad de repoblar a los inventarios se importa ganado de razas lecheras, impactando a corto plazo en el crecimiento de la producción de leche. <sup>(1)</sup>

Si bien a principios del presente siglo se observa un incremento de la demanda por el lácteo, se puede decir que la consolidación de la lechería comercial se da a partir de los años 40's condicionado por el desarrollo industrial y el mercado interno. En el periodo 1950-1970 se presenta un proceso de integración horizontal y vertical de la actividad lechera; dando como resultado algunas de las pasteurizadoras e industrializadoras de lácteos que actualmente existen. No obstante gran parte de la ganadería conserva su forma tradicional de producir leche. Es durante este tiempo, cuando se analizan recursos crediticios para apoyar a los productores, interesados en proyectos lecheros y se conforman cuencas lecheras con las características que conocemos actualmente. Este es el caso de la cuenca lechera de la laguna (en Durango y Coahuila). En estos años y por la cercanía de la Zona Metropolitana de la Ciudad de México, las cuencas lecheras de importancia se ubican en los estados de México, Puebla, Hidalgo, Tlaxcala y Distrito Federal <sup>(1)</sup>

Gómez O.R.S et al, en el año de 1994, explica sobre la producción e importación de leche de vaca en polvo de 1950 al 2010 en México.

Menciona que México es un país deficitario de Leche y para abastecer una creciente demanda de este producto básico, importa entre el 30 y 40 % de consumo nacional. <sup>(59)</sup> Del producto importado destina el 62% para los programas de abasto social y el 38% restante es consumido por la industria alimenticia <sup>(36)</sup>.

La importación de la leche de vaca en polvo en los últimos años tuvo un costo promedio de 366 mdd anuales; es así que México se convierte en el principal importador mundial de leche en polvo, situación que afectó aparentemente al volumen de producción lechera nacional, que se estima en 6,361 millones de Litros para 1995, significando una baja de 13.1% con respecto a 1994, que a su vez cerró con una contracción de 1.1% con respecto al año de 1993<sup>(38)</sup>

La industria lechera nacional esta condicionada a la enorme importación de leche en polvo, la estructura productiva, las condiciones del mercado, el costo del dinero, la inflación y los subsidios a los productores en el mercado mundial de mas del 60% sobre el valor de la producción <sup>(38,55)</sup>, que en conjunto son factores que inhiben la actividad lechera nacional y dan la impresión de que, la industria lechera mexicana y su gobierno federal han suplido el déficit de la producción con la importación de leche en polvo<sup>(55)</sup>

## **1.2 Problemas que inciden en la producción de leche**

El período de transición establece las bases para el nivel y producción de leche posterior de una vaca, el riesgo de enfermedad metabólica y la eficiencia reproductiva. Puesto que la producción de leche y la reproducción son impulsores clave de la rentabilidad de la lechería, una administración de calidad de la transición es esencial para reducir las pérdidas económicas y de desempeño. A medida que una vaca preñada se acerca al parto, experimenta tremendos ajustes fisiológicos. El sistema mamario se prepara para la producción de leche y el feto sigue creciendo, mientras que la vaca trabaja para mantener el balance energético, la regulación de calcio, la adaptación del rumen y un sistema inmune fuerte. Con todos estos retos, no es de sorprender que las vacas en transición tengan un alto riesgo de enfermedad metabólica.

La fiebre láctea, la cetosis, las membranas fetales retenidas y la metritis son ejemplos de condiciones metabólicas e infecciosas que afectan principalmente a las vacas dentro de las primeras tres semanas de lactancia. Estas enfermedades ocasionan importantes pérdidas económicas al reducir el rendimiento de leche, genera costos reproductivos, de tratamiento y asociados con un mayor desecho (ver tabla 1).

**Tabla 1.** Transtornos relacionados con el parto

<b>ENFERMEDAD</b>	<b>TRANSTORNOS QUE SE RELACIONAN CON EL PARTO</b>
<b>Fiebre láctea</b>	Deficiencia de calcio que ocasiona disfunción neuromuscular progresiva con parálisis plácida, colapso circulatorio y depresión de la conciencia.
<b>RFM</b>	Membranas fetales visibles en la vulva o en la vagina o en el útero durante el examen vaginal.
<b>Metritis</b>	Secreción cervical y/o vaginal anormal o contenido uterino provocando una inflamación
<b>Cetosis</b>	Disminución del apetito, elevación de las cetonas en leche, la orina o el aliento en ausencia de otra enfermedad.
<b>Quistes ováricos</b>	Estructura lisa y redonda mayor de 25 mm de diámetro en uno o ambos ovarios en vacas no preñadas.
<b>Cojera</b>	Episodio de marcha normal atribuible ya sea a la pata o a la pezuña sin importar su etiología o duración.
<b>Mastitis</b>	Secreción de leche visualmente anormal de uno o más cuartos con o sin señales de Inflamación de la ubre. Nuevo caso después de ocho días de leche normal

### 1.2.2 Enfermedades de la ubre

Las repercusiones económicas derivadas de las enfermedades de la ubre de las vacas lecheras son considerables. La producción de leche disminuye y enfermedades muy graves puede continuar descendiendo la producción de leche o incluso agotarse por completo.

#### 1.2.2.1 Edema mamario.

Edema mamario natural.

Todos los ganaderos y ordeñadores saben que la mama aumenta considerablemente de tamaño en ocasiones después del parto. La piel de la ubre aparece tensa e íntimamente unida al tejido glandular. El aumento del tamaño de la glándula es debido a un enriquecimiento de líquido en la piel y en el tejido conjuntivo de la misma ubre y se llama edema. <sup>(24)</sup>

#### 1.2.2.2 Traumatismos.

La mama está expuesta con frecuencia a sufrir traumatismos. Reiteradamente padece heridas contusas, incisas, punzantes y desgarras, debidos a los pisotones de reses vecinas, Al manejo de cuidado de utensilios puntiagudos o cortantes, clavos, ganchos, etc. Muchas heridas mamarias se producen en el campo cuando los animales rompen o saltan las vallas de alambre de púas o de estacas. Las heridas por mordeduras de perros mal adiestrados no son raras



tampoco en el campo. Las sustancias químicas irritantes o la intensa irradiación solo originan a veces lesiones en la ubre <sup>(24)</sup>.

#### 1.2.2.3 Evacuación de sangre por los pezones.

Durante los primeros días que siguen al parto, raramente en otras fases de lactación, es frecuente hallar una coloración rojiza en la leche de uno o varios cuarterones, sobre todo en vacas de alta producción. Casi siempre queda en el filtro algo de sangre coagulada. Se trata de una mezcla de sangre procedente de pequeños vasos rotos. Las carencias de vitamina C o Calcio pueden originar el mismo fenómeno, aunque las paredes vasculares se conserven intactas <sup>(24)</sup>.

#### 1.2.2.4 Hipogalactia

Entendemos por hipogalactia y agalactia la disminución o ausencia completa de secreción láctea. Las causas son muy numerosas. Los siguientes factores desempeñan un papel importante:

- Desarrollo deficiente de la glándula mamaria.
- Trastornos hormonales y nervios en la lactogénesis.
- Empleo anticipado de las novillas para la reproducción.
- Período seco omitido o breve.
- Adiposis.
- Estados carenciales; baja nutrición y deficiencias de calcio, fósforo, vitaminas, oligoelementos, etc.
- Edad muy avanzada.

- Influencias meteorológicas, dificultades de aclimatación al cambiar de lugar.
- Deficiencia de agua.
- Partos prematuros.
- Estados de agitación consecutivos a largas enfermedades; por ejemplo: diarreas, glosopeda, etc.
- Alimentación inadecuada; sobrecarga-proteica.
- Intoxicaciones agudas y crónicas.
- Afecciones mamarias.

#### 1.2.2.5 Retención de la leche.

La retención de la leche es una forma especial de hipogalactia. La lactogénesis es normal, pero la evacuación de la leche está bloqueada por influencias nerviosas es decir, la leche “no baja” <sup>(24)</sup>

#### 1.2.2.6 Exantemas medicamentosos y de origen alimenticio.

En la mama se pueden desarrollar eczemas húmedos y costrosos tras la administración de alimentos determinados, o tras el empleo de algunos medicamentos (preparados de yodo, bromo, plomo, etc.) A veces se necrosan porciones cutáneas enteras (hasta el tamaño de la palma de la mano y mayores) y se desprenden del tejido subyacente <sup>(24)</sup>

#### 1.2.2.7 Verrugas

En la mama se forman a veces verrugas pediculadas y de base ancha, de tamaños y formas diversas. Las verrugas aisladas carecen de importancia generalmente, pero las grandes pueden dificultar el ordeño, sobre todo si radican en los pezones.

Es sabido que estas verrugas desaparecen frecuentemente por sí solas después de algún tiempo. Las verrugas pediculadas se pueden desprender ligándolas con un hilo limpio o arrancándolas por torsión directamente. Las erosiones resultantes se tratan con tintura de yodo <sup>(24)</sup>

#### 1.2.2.8 Viruela mamaria.

Son originadas por el mismo virus, si bien existen diversos tipos. La virulencia se atenúa al pasar de la vaca al hombre, los cuadros clínicos no son tan graves como en los casos de contagio de hombre a hombre. En los animales se efectúa por medio de las manos del ordeñador y de las pezoneras, aunque intervienen también las moscas <sup>(24)</sup>

#### 1.2.2.9 Glosopeda.

Son ampollas gris plateadas o amarillentas en la piel de la ubre y en los pezones. Cuando estallan dejan erosiones dolorosas y en parte también úlceras. Las consecuencias son graves dificultades para el ordeño. <sup>(24)</sup>

En la vigilancia de las vacas lecheras es muy importante prestar atención especial a la mastitis, ya que es muy necesario evitar en gran medida su propagación y para poder instaurar el tratamiento a tiempo

<sup>(24)</sup>

### 1.2.3 Problemática mundial de los residuos de plaguicidas.

La presencia de plaguicidas como contaminantes en los alimentos, especialmente en la leche materna como eslabón final de la cadena alimentaria, ha pasado de un aspecto puramente científico a un problema social de extrema importancia.

Los plaguicidas autorizados para uso pecuario y en pastos, son por lógica los que mayores probabilidades tienen de estar presentes en la leche, aunque no se excluye la posible contaminación, debido al consumo de subproductos de otros cultivos como fuente de alimento.<sup>(48)</sup>

### 1.2.4 Efectos adversos de los residuos de antibióticos en la leche

Después de la administración de cualquier tratamiento veterinario, sus residuos aparecen en los productos comestibles obtenidos de los animales tratados. Los posibles peligros para la salud a causa de los residuos de los antibióticos en los alimentos pueden dividirse por su naturaleza en tres grupos principales; toxicológicos, microbiológicos (relativos a la resistencia transmisible) e inmunopatológicos. Se ha demostrado que los residuos de medicamentos o productos químicos pueden presentar además de los toxicológicos uno o varios de los siguientes efectos. <sup>(48)</sup>

:

- CARCINÓGENICOS
- MUTAGÉNICOS
- TERATÓGENICOS
- INDUCCION DE ALERGIA O DE HIPERSENSIBILIDAD

En el tratamiento de la mastitis, la penicilina se administra, tanto vía intramamaria como vía parenteral, pues además de la infusión intramamaria a través del canal de la ubre, algunos casos de mastitis bovina requieren un tratamiento general con fármacos antimicrobianos, en lo que reside otra posibilidad de contaminación de la leche. <sup>(48)</sup>

La mastitis ha sido señalada como una de las causas de la deficiencia de la producción de leche, ha sido una de las enfermedades más costosas del ganado lechero, que por lo general no son reconocidos; sin embargo son reales, y afectan las ganancias netas del productor. En un estudio realizado en un hato del altiplano de México con 500 animales en ordeño, se determinó que anualmente se pierde por mastitis \$ 244,797, que equivalen a la producción por lactancia de 305 días de 43 vacas con 6000 kg cada una. <sup>(48)</sup>

Muchos ganaderos contabilizan sus pérdidas económicas por mastitis considerando:

1. Gastos por servicio Médico Veterinario
2. Medicamentos y leche desechada
3. Reemplazo temprano de la vacas afectadas
4. Valor reducido de las vacas eliminadas
5. Aumento de los costos de la mano de obra. <sup>(3)</sup>

Por lo que representa un gasto diario muy aparente; pero casi insignificante comparado con la deficiencia de producción de leche y reemplazos de ganado. (3)

La vaca lactando tiene una fuerte tendencia a producir leche de composición uniforme según el grupo genético al que corresponda, pero al darse un proceso inflamatorio en la glándula mamaria, se altera la permeabilidad vascular, hay exudado y se modifica la composición de la leche, la reducción en el contenido de grasa, caseína, lactosa, e incrementos en proteínas provenientes de inmunoglobulinas, seroglobulinas, a si mismo se dan aumentos de cloruro de sodio y bicarbonato. (19)

### 1.3 MASTITIS

La mastitis puede ser originada por una infección microbiana, alguna alteración fisiológica o debido a un traumatismo. (57)

Cualquier lesión del tejido interno de la glándula mamaria provoca una respuesta inflamatoria o mastitis (ver imagen 1). (57)

Esta se inicia cuando una bacteria penetra a través del orificio del pezón de la glándula, de ser favorable el medio en el interior de la glándula el microorganismo se multiplica y los productos del metabolismo de este lesionan los tejidos internos, irrita a la ubre e interfiere en el flujo normal y la calidad de la leche causando inflamación. (57)



**Imagen 1.** Ubre con mastitis

El término deriva del griego mastos = mama (glándula mamaria) e ítis = inflamación. La inflamación de la glándula mamaria; se presenta comúnmente como una respuesta a la invasión por el microorganismo y

se caracteriza por daños en el epitelio glandular, seguido por una inflamación clínica o subclínica, pudiendo presentarse por cambios patológicos localizados o generalizados, dependiendo de la magnitud del daño. <sup>(57)</sup>

Algunas veces hay confusión en la discusión de la mastitis debido a los distintos significados implicados en el mismo término, por lo tanto se presentan las siguientes definiciones: <sup>(3)</sup>

#### 1.3.1 Mastitis subclínica.

Es una forma de mastitis en la que no hay cambio fácilmente detectable en la ubre y no se observa anormalidad en la leche. Sin embargo la presencia de microorganismos normalmente puede ser demostrada por un cultivo microbiológico y los cambios inflamatorios en la leche pueden ser detectados a través de pruebas especiales. Debido a que esta forma de mastitis no es obvia para el productor, ellos a menudo no saben de la extensión de sus pérdidas <sup>(3)</sup>

#### 1.3.2 Mastitis clínica

Es la mastitis en la cual se observan anormalidades en la ubre y/o secreción, la mastitis clínica puede variar notablemente en severidad dependiendo en parte al tipo de microorganismo <sup>(3)</sup>



### 1.3.3 Mastitis clínica subaguda.

Las alteraciones obvias son los cambios en la leche, tales como escamas, grumos y/o apariencia acuosa. El calor, hinchazón y sensibilidad de la ubre son leves o ausentes <sup>(3)</sup>

### 1.3.4 Mastitis clínica aguda

Hay un inesperado comienzo de hinchazón., color, dureza y sensibilidad de la glándula afectada. La apariencia de la leche es anormal y la producción disminuye <sup>(3)</sup>

### 1.3.4 Mastitis aguda con signos sistemáticos.

Si la vaca muestra signos de enfermedad, estos pueden incluir: fiebre, pérdida del apetito, debilidad y depresión. Cuando el comienzo de la enfermedad es muy rápida y los signos muy severos, la enfermedad es denominada mastitis hiperaguda <sup>(3)</sup>

### 1.3.6 Mastitis crónica.

Es de larga duración. Puede permanecer en una fase subclínica indefinidamente o puede alterarse entre fases subclínica y clínica, o los signos clínicos pueden persistir por largos periodos <sup>(3)</sup>

La mastitis en base a los organismos que la producen se clasificara de la siguiente manera <sup>(19)</sup>, como se muestra en la tabla 2.

1.3.7 Mastitis por microorganismos contagiosos: que colonizan a la glándula mamaria y que pueden ser propagados por las ordeñadoras mecánicas y por los ordeñadores, ver tabla 3.

1.3.8 Mastitis por microorganismos ambientales: estos microorganismos no se encuentran en la vaca pero están presentes en el medio ambiente y los podemos encontrar en el agua contaminada, estiércol, y pueden estar en la ubre en los periodos de ordeño, ver tabla 4.

**Tabla 2.** Bacterias causantes de mastitis.

<b>Bacterias contagiosas</b>	<b>Bacterias ambientales</b>
<input type="checkbox"/> <i>Streptococcus agalctiae</i> <input type="checkbox"/> <i>Streptococcus dysgalactiae</i> <input type="checkbox"/> <i>Staphylococcus aureus</i> <input type="checkbox"/> <i>Micoplasma spp.</i>	<input type="checkbox"/> <i>Escherichia coli</i> <input type="checkbox"/> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <input type="checkbox"/> <i>Enterobacter aerogenes</i> <input type="checkbox"/> <i>Serratia spp.</i> <input type="checkbox"/> <i>Proteus spp</i> <input type="checkbox"/> <i>Pseudomonas spp.</i> <input type="checkbox"/> <i>Staphylococcus, coagulasa negativo</i> <input type="checkbox"/> <i>Levaduras</i> <input type="checkbox"/> <i>Hongos</i> <input type="checkbox"/> <i>Prototheca</i> <input type="checkbox"/> <i>Actinomyces</i> <input type="checkbox"/> <i>Corynebacterium ovis</i> <input type="checkbox"/> <i>Nocardia asteroides</i>

Tabla 3. Bacterias contagiosas.

Bacteria	Signos	Diagnóstico	Tratamiento
<i>Streptococcus agalactiae</i>	Estados febriles, anomalías de la leche durante el ordeño.	Cultivo de los primeros chorros de leche, prueba de CMT.	Penicilina, cloxacilina, eritromicina, cefalosporinas.
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	Chorros de leche previos al ordeño se observan coágulos y copos. Fiebre ligera y un cuarto hinchado, caliente y con secreción normal.	Prueba de CMT, y Cultivo de la leche	Penicilina, cloxacilina, cefalosporinas.
<i>Staphylococcus aureus</i>	Puede haber signos benignos inespecíficos (leche anormal, coágulos, copos secreción acuosa). Presenta estados febriles.	Prueba de CMT, recuento de células somáticas, cultivo de la leche.	Penicilina, ceftiofur, cloxacilina, cefalosporinas, pirlimicina.
<i>Mycoplasma spp.</i>	Cuarto afectado, caliente, hinchado y duro. Secreciones de aspecto variable, la leche disminuye.	Recuento de células somáticas, cultivo de la leche (se utiliza el medio Hayflick) incubado a 37°C y manteniendo 1 atm con el 10% de CO <sub>2</sub> .	Antibióticos macrólidos y tetraciclínicos.

Tabla 4. Bacterias ambientales.

microorganismo	Signos	diagnóstico	tratamiento
<i>Staphylococcus</i> coagulosa negativo.	No existe signo clínico alguno que identifique de modo específico un <i>Staphylococcus</i> coagulosa negativo.	Recuento de células somáticas en la leche; cultivos y recuentos bacterianos.	Se indican los baños yodados en los Pezones.
<i>Actynomices</i> <i>Pyogenes</i>	Hay hinchazón del cuarto infectado generalmente es aguda, inflamada y dolora, hay estados febriles.	Cultivo de la Leche	Penicilina
*Coliformes, lactosa +: <i>E. coli</i> <i>Klebsiella spp.</i> <i>Enterobacter spp</i>	Inflamación de un cuarto, asociada con signos sistémicos, secreciones parecida al suero o “acuosa”, hipocalcemia, hipocaliemia, acidosis láctica.	Medición de pH en la leche y cultivo.	Gentamicina, amikacina, trimetoprim sulfatomexasol, ticarcilina-ácido clavulónico
<i>Pseudomonas spp.</i>	Cuarto duro, hinchado y caliente, secreción parecida al suero, con sangre y con coágulos	Cultivo de la leche	-----

<i>Candida spp.</i>	Cuarto hinchado difusamente ligeramente duro al tacto. Hay estados febriles.	Realizar frotis teñido y cultivo de la leche	Miconazol, nistatina, preparados de yodo en éter.
<i>Protoheca spp.</i>	Secreciones anormales en cualquiera de las glándulas hinchadas, duras o colapsadas, secreciones con pus.	Identificación microscópica y cultivo de la leche	-----
<i>Corynebacterium ovis</i>	La infección de la glándula mamaria es mínima.	Recuento de células somáticas, cultivo de la leche.	-----
<i>Nocardia Asteroides</i>	Mastitis aguda en vacas recién paridas con cuartos duros. Mastitis benigna o subclínica en la lactación. Algunas vacas desarrollan reacciones piogranulomatosas en los cuartos infectados. Esto puede conducir a fístulas o a abscesos drenantes.	Cultivo de la leche	El tratamiento rara vez es eficaz.. Identificación y eliminación selectiva de las vacas infectadas.

## 1.4 *Nocardia asteroides*

### 1.4.1 Generalidades.

En 1888 **Nocard** aisló un germen filamentoso, aerobio, de una enfermedad del ganado vacuno conocida como *farcin de boeuf* o lamparón bovino. La enfermedad estaba caracterizada por infarto y ulceración de los ganglios linfáticos regionales de las extremidades. Se denominó al organismo *Nocardia farcinica*. En 1891 **Epinger** aisló un microorganismo similar de un absceso cerebral humano y fue reconocido como *Clasdothrix asteroides*, se rebautizó como *Nocardia asteroides*. Los trabajos recientes de **Gordón y Mihm** (1962) precisan que no pueden separarse *Nocardia asteroides* y *Nocardia farcinica*. Ha quedado reconocido por el nombre de *Nocardia asteroides* para esta especie. El género *Nocardia* contiene otras dos especies patógenas notables, *Nocardia brasiliensis* y *Nocardia caviae*. De las restantes 41 especies que han sido descritas, algunas parecen estar relacionadas con el género *Mycobacterium* otra con el género *Streptomices* y las restantes carecen de importancia patógena para los animales. <sup>(68)</sup>

Las *Nocardias* están emparentadas con las *Micobacterias* por la composición de la pared celular. <sup>(13)</sup> Cummings ha demostrado que existen semejanzas antigénicas entre las pared celular de *Nocardia*, *Micobacterias*, *Corinebacteria*, en cuyas paredes celulares se encuentran arabinosa y galactosa <sup>(13)</sup> como se observa en la imagen 2. Las bacterias desde el punto de vista médico y emparentado entre sí hasta cierto punto, están incluidas, en el llamado grupo CMN (*Corynebacterium-Mycobacterium-Nocardia*) <sup>(13)</sup>

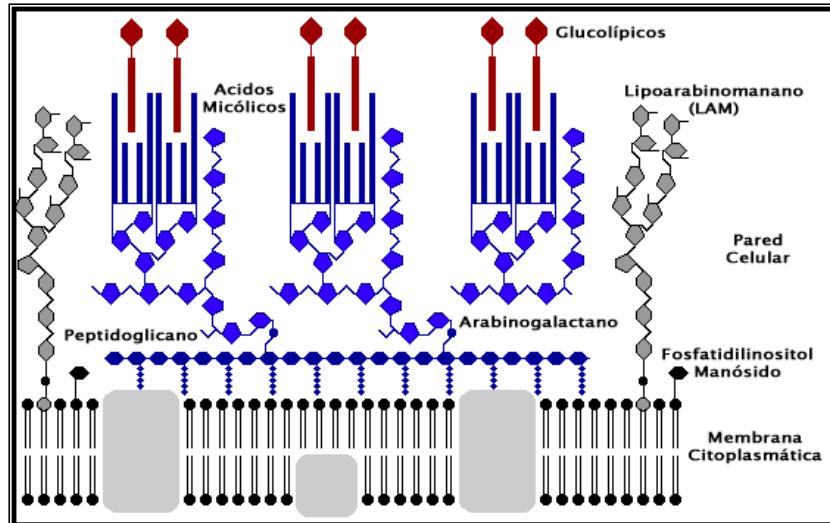
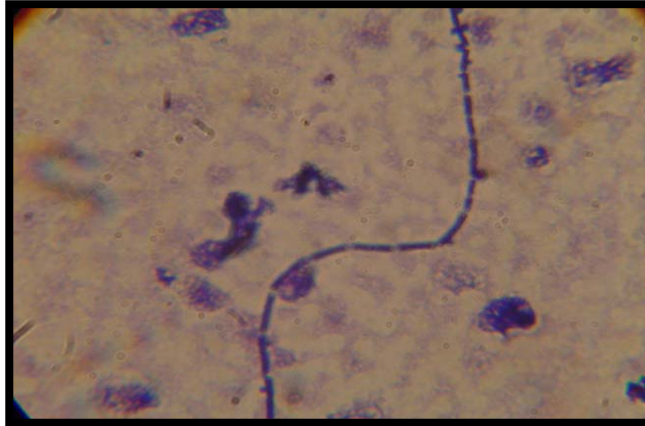


Imagen 2. Componentes de la pared celular de *Nocardia asteroides*

#### 1.4.2 Morfología e identificación.

*N. asteroides* crece en una gran variedad de medios. Durante el curso de varios días hasta semanas o más, estas bacterias desarrollan colonias irregulares, hacinadas y de aspecto ceroso. Las cepas, varían en cuanto a pigmentación, desde blanco, naranja hasta rojo.

Son cocobacilos aerobios, grampositivas, catalasa-positivas, producen ureasa, miden de 0.2-1.0 micras de grosor. En material clínico es frecuente que forme ovillos. (13)



**Imagen 3.** Tinción de Gram., *Nocardia asteroides* bacilo Gram +, visto con el aumento de 100 x

Las *Nocardias* son parcialmente acidorresistentes y forman un micelio ramificado delgado que se descompone en elementos bacilares y cocoides. Producen un micelio aéreo discreto dependiendo de las condiciones culturales. <sup>(13)</sup>

Por los caracteres fisiológicos y bioquímicos, en *Nocardia asteroides* se clasifican en dos subgrupos, el A y el B. La diferenciación serológica divide la especie en cuatro serotipos (I al IV). <sup>(13)</sup>

Las especies de *Nocardia* se identifican <sup>(32,68)</sup> mediante las pruebas fisiológicas de rutina como Gram, catalasa, oxidasa y sus propiedades metabólicas diferenciales se presentan en la tabla 5.



**Tabla 5.** Pruebas bioquímicas. <sup>(32)</sup>

<i>Nocardia asteroides</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Descompone y utiliza la parafina como una fuente de carbono y energía.</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Producción de catalasa</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Producción de ureasa</li> </ul>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Reducción de nitratos a nitritos.</li> </ul>

## 1.4.3 Enfermedades en diversas especies animales.

**Tabla 6.** Animales domésticos hospederos. <sup>(67)</sup>

<b>Especie</b>	<b>Hospedero</b>	<b>Enfermedad</b>
<i>Nocardia asteroides</i>	Perro	Nocardiasis canina <input type="checkbox"/> Piogranulomas cutáneos <input type="checkbox"/> Lesiones pleurales <input type="checkbox"/> Lesiones diseminadas
	<b>Vacas</b>	<b>Mastitis</b> , abortos
	Cerdos	Abortos
	Ovejas, cabras, caballos	Heridas infectadas, mamitis, neumonía, otros procesos piogranulomatosos.

Como se puede apreciar en la tabla 6. La manifestación clínica frecuente en el ganado vacuno es la mastitis que puede ser aguda (hemorrágico-necrosante), con alteración del estado general, o crónica con abscesos y fibrosis. La infección permanece generalmente localizada en la mama. Es consecuencia del tratamiento intramamaria

con asepsia deficiente por el uso de cánulas sucias o de medicamentos portadores de *Nocardias*. Por este motivo pueden presentarse enzoóticamente estas infecciones. Las terapias casi nunca da resultado, razón por la cual hay que formular un mal pronóstico. A veces se observan lesiones crónicas granulomatosas o también abortos en la vaca. <sup>(67)</sup>

#### 1.4.4 Patogénesis y datos clínicos

La infección, es oportunista, se asocia con inmunodepresión o alternativamente puede seguir una inoculación masiva. El mecanismo de infección más habitual es mediante la inhalación, pero también se puede producir, a través de heridas de piel o por el canal del pezón. Una forma intestinal de nocardiosis puede producirse por ingestión de los microorganismos. <sup>(50)</sup>

#### 1.4.5 Formas clínicas.

Mastitis aguda en vacas recién paridas con fiebre y cuarterones duros, mastitis benigna en las vacas adelantadas en la lactación. En tal caso pueden manifestar mastitis aguda grave después del parto siguiente o pueden seguir estando infectadas crónicamente con exacerbaciones subclínicas o agudas intermitentes. La fibrosis de la glándula es progresiva en la mayoría de los casos y algunas de ellas pueden desarrollar reacciones piogranulomatosas en los cuarterones infectados. Esto puede conducir a fístulas o abscesos drenantes. <sup>(63)</sup>

#### 1.4.6 Pruebas diagnósticas de laboratorio.

La demostración microscópicamente del agente causal en material clínico de procesos agudos (leche) se logra en extensiones teñidas por el método de Gram (filamentos finos ramificados y liados a ovillos). El método de Ziehl- Neelsen es una tinción donde las especies de *Nocardia* son acidorresistentes (o “parcialmente acidorresistentes). La identificación de la bacteria es bastante más difícil en las infecciones crónicas. Por eso es preciso repetir los exámenes o recurrir a una Biopsia. (13)

Las muestras apropiadas para el examen de laboratorio incluyen: exudados, coágulos, leche mastica y material de biopsia: tejido de granulomas y tejido fijado para Histopatología. Los frotis sometidos a tinción de Gram revelan la presencia de bacilos gram positivos, células cocobacilares y filamentos ramificantes. Con la técnica modificada de fijación de ácido, la mayoría de los aislados son fijadores de ácido. Las especies de *Nocardia* crecen en Los medios enriquecidos como agar Sangre, agar Infusión Cerebro Corazón entre otros. Hasta la fecha, todavía no se dispone de pruebas serológicas para el diagnóstico de nocardiosis.(32)

#### 1.4.7 Tratamiento.

Rara vez es eficaz, se identifican y se eliminan las vacas infectadas. *Nocardia asteroides* es bastante resistente a los antibióticos betalactámicos (penicilina, entre otros) pero muy sensible al cloranfenicol, los aminoglucósidos y las sulfamidas. <sup>(13)</sup>, pero en la actualidad no son tan efectivas para las infecciones.<sup>(32)</sup>

Los perjuicios económicos derivados de las afecciones mamarias de las vacas lecheras son considerables. La producción de leche disminuye cuando hay infecciones mamarias crónicas. Hay que añadir que en las enfermedades graves puede continuar descendiendo la producción lechera o incluso agotarse por completo. <sup>(63)</sup>

#### 1.4.8 Diagnóstico de la mastitis.

El diagnóstico precoz de esta enfermedad es necesario para evitar en gran medida su propagación y para poder instaurar el tratamiento a tiempo, pues de esto depende el resultado. En el establo es posible realizar las diversas pruebas que denuncian ya una alteración en la secreción láctea, para la identificación del agente infeccioso, es imprescindible el examen bacteriológico de la leche en el laboratorio.

<sup>(56)</sup>

## 1.4.9 Pruebas de establo.

## a) Prueba del ordeño previo.

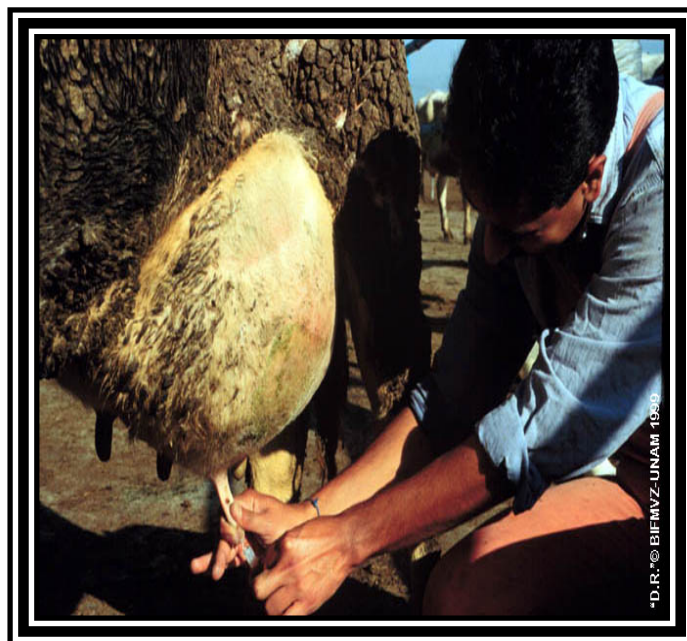
Los primeros chorros se ordeñan en una cubeta o recipiente especial, la superficie interna es negra para poder reconocer las alteraciones de la leche sobre fondo oscuro (acuosidad, formación de copos, mezcla de componentes extraños, etc.) ver imagen 4.



**Imagen 4.** Primera ordeña de la mañana.

## b) Examen físico de la ubre.

Uno de los signos de la mastitis incluye a los cuartos inflamados o de toda la glándula. Los cambios en el tamaño, dolor al tacto, enrojecimiento del área afectada y aumento de temperatura, se detectan más fácilmente después del ordeño.



**Imagen 5.** Palpación de la ubre para detectar signos de la mastitis.

## c) Conductividad eléctrica de la leche.

La prueba de conductividad se ha utilizado como un indicador de la mastitis, se basa en el aumento de la conductividad eléctrica de la leche debido a su mayor contenido electrolítico especialmente iones sodio y de cloro y se ha desarrollado como método para monitorear el estado de la mastitis en la vaca.



**Imagen 6.** Prueba de la conductividad eléctrica.

## d) Cultivo bacteriano

Las bacterias presentes en las muestras de leche proceden de las ubres infectadas, de los pezones y de diversas fuentes ambientales. El análisis microbiológico es un método eficaz para saber quienes son los principales organismos que ocasionan la mastitis.



**Imagen 7.** Reacción ácida en el tubo amarillo, presencia de microorganismos patógenos.



## e) Prueba de la mastitis de California. (CMT)

La prueba de California para Mastitis ha sido empleada durante décadas ya que es muy utilizada para el diagnóstico de mastitis en el ganado bovino lechero. Una prueba sencilla la cual puede valorar el recuento de células de la leche, nos indica si el conteo de células es elevado o bajo. La prueba consiste en el agregado de un detergente a la leche, el alquilauril sulfonato de sodio, causando la liberación del ADN de los leucocitos presentes en la ubre y este se convierte en combinación con agentes proteicos de la leche en una gelatina. Si hay mayor presencia de células se libera más ADN, por lo tanto será de mayor formación de gelatina. La CMT es muy útil para identificar la mastitis subclínica.



**Imagen 8.** Prueba de Mastitis de California positiva, presencia de precipitados, grumos o gelatina.

## 1.5 PROPOLEO.

### 1.5.1 Antecedentes

Aristóteles ya hablaba de propóleo y lo consideró como remedio para infecciones de “piel, llagas y supuraciones” .Galeno, en el siglo II, menciona al propóleo en sus trabajos así como el filósofo Persa Avicena. Los incas lo utilizaban cuando se presentaba un cuadro de infecciones febriles y los franceses en los siglos XVII y XIX para el tratamiento de llagas. Pero se empleo en África del Sur en la guerra de los Bornes en el año de 1900 para tratar heridas y como cicatrizante <sup>(40)</sup>

### 1.5.2 Origen

El Propóleo es una resina utilizada por las abejas para cubrir y proteger la colmena, las abejas obtienen esta sustancia a partir de yemas y cortezas de algunos árboles, siendo una actividad natural de la *Apis mellifera*, imagen 9, esta resina se origina de las sustancias recolectadas por las abejas de hojas de plantas mezclándolas con el polen y con algunas enzimas secretadas por la propia *Apis mellifera* (ver imagen 10). <sup>(50)</sup>



**Imagen 9.** *Apis mellifera* recolectando polen y otras sustancias en la flor.



**Imagen 10.** *Apis mellifera* secretando propoleo.

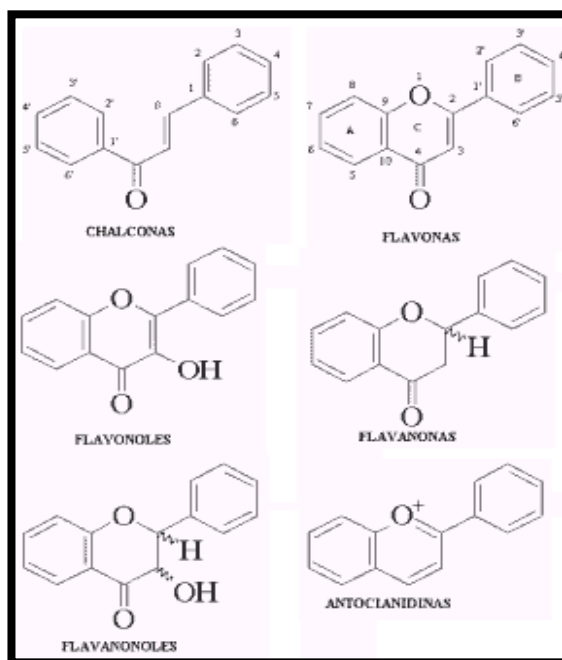


**Imagen 11.** Propoleo extracto crudo.

### 1.5.3 Composición.

Es rico en bioflavonoides y aceites esenciales; además de contener oligoelementos, vitaminas y aminoácidos. Es muy variable su composición dependiendo de la flora y el clima del lugar. Se han encontrado 250 elementos constitutivos y unos 50 principios biológicamente activos, lo que explica su gran cantidad de propiedades. De los cuales un 50% son compuestos fenólicos<sup>(48)</sup> a los que se les atribuye acción farmacológica; entre los fenoles identificados se encuentran; flavonoides (flavonas, isoflavonas, flavononas, ver imagen 12); ácidos aromáticos, sus esteres (ácido caféico, cinámico y otros) y aldehídos aromáticos (vainillina e isovainillina, cumarinas, triglicéridos fenólicos).<sup>(50)</sup>

Su color es variable de negro-café hasta amarillo dependiendo del origen<sup>(4)</sup>; imagen 11, su olor también difiere, la mayoría de los casos es agradable y otros recuerdan a su origen vegetal, además poseen un olor predominante a cera.<sup>(15)</sup>



**Imagen 12.** Compuestos fenólicos de acción farmacológica encontrados en el propóleo.

#### 1.5.4 Propiedades.

Científicamente se le han demostrado más de 20 propiedades:<sup>(14,5,43,42,28,27,7,41,16,62,59)</sup>

Antimicrobiana, antiinflamatoria, hepatoprotectiva, antioxidativa, estimulante del Sistema inmune, anticariogénico, anticarcinogénico, antiulceroso, antitumoral, inmunomodulador, antifúngico, antiviral, antilarvario, analgésico, preservador, antialérgico, vasodilatador, agregante plaquetario, protector de circulación, permeabilidad y fragilidad capilar, regulador y estimulante tiroideo.

## 1.5.5 Mecanismo de acción.

Del propoleo se han aislado más de 250 elementos. Al igual que en Europa se ha investigado a este compuesto y se le han encontrado más de 160 principios activos diferentes, la mayoría de ellos corresponden a los fenoles a los cuales se les atribuye sus propiedades farmacológicas. Además contiene pequeñas cantidades de taninos y terpenos. Brasil reporta que en el propoleo rojo se encuentran mas de 14 componentes fenólicos, triterpenoides, naftoquinonas, benzofenonas, entre otros; que muestran actividad contra *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* (6)

La actividad biológica del propoleo depende de muchos factores como: el tiempo de recolección, el método de extracción, la flora del lugar, etc., En la siguiente tabla se muestran algunos propóleos de diferentes lugares con actividad biológica. (6,40)

Propoleo (origen)	Actividad antiinflamatoria	Actividad antitumoral	Actividad hepatoprotectora	Actividad antioxidante	Acción alérgica	Acción antibacterial
CUBANO	-----	Benzofenonas preniladas	-----	Benzofenonas preniladas	-----	Benzofenonas preniladas
EUROPEO	Flavononas, ácidos fenólicos y ésteres	Acido caféico, éster de fenilo	Acido caféico, éster de fenilo	Acido caféico y sus ésteres	3,3-Dimetil alil cafeato	Flavononas, ácidos fenólicos y ésteres
BRASILIENSE	-----	Diterpenos, benzofuranos, Acidos p-coumáricos prenilados	Flavonoides	Acidos p-coumáricos	-----	Diterpenos, Acidos p-coumáricos, prenilados
TAIWANES	-----	Flavononas preniladas	flavononas	Flavononas preniladas	-----	-----

**Tabla 7.** Compuestos con actividad biológica encontrados en diferentes propóleos.

Por otra parte se menciona que el mecanismo de acción del propoleo es muy complicado (29) y solo se atribuye al sinergismo entre flavonoides,

hidroxiácidos, compuestos fenólicos, esterés y sesquiterpenos (18, 31, 35,62)

Se ha estudiado el efecto del propoleo sobre la fisiología de los microorganismos como *Bacillus subtilis*, *Escherichae coli* y han encontrado que los componentes cinámicos y flavonoides apartan la energía de transferencia de la membrana citoplasmática e inhiben la motilidad de estas bacterias. Debido a que también ejerce un efecto bactericida por la presencia de muchas sustancias activas, es considerado como una agente de amplio espectro. (45)

Se ha investigado el efecto del propoleo en *Streptococcus agalactiae*, por métodos colorimétricos y microscopia electrónica se ha estudiado el posible mecanismo de acción antibacterial del propoleo, donde se demostró que este extracto inhibe el crecimiento de la bacteria; evitando la división de la célula, por consiguiente la formación de *Streptococcus* pseudomulticelulares, además desorganiza el citoplasma, la membrana citoplasmática y la pared celular causando una bacteriólisis parcial e inhibe la síntesis de proteínas. Es evidente que el mecanismo de acción del propoleo es complejo en células bacterianas, ya que no tiene el mismo modo de acción de los antibióticos clásicos. (45)

En la actualidad el propoleo ha tenido una gran importancia en la medicina popular, en particular se ha estudiado el efecto sobre los patógenos de la cavidad oral, causantes de infecciones. *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescences* aisladas y recuperadas de pacientes con periodontitis; donde estos microorganismos son susceptibles a Penicilina, Eritromicina, Metronidazol así como al

propoleo, por lo que se han sugerido más investigaciones del propoleo en las infecciones bucales. <sup>(54)</sup> También se ha demostrado que el propoleo tiene acción inhibitoria sobre los factores de virulencia semejantes a la actividad de la Lipasa y la Coagulasa de *Staphylococcus aureus*. Además hay una interacción negativa con la adhesión a células y el Biofilm formado por este organismo. <sup>(54)</sup> Así como el *Streptococcus mutans* donde el propoleo inhibe la formación y el desarrollo del Biofilm.

## 1.6 JUSTIFICACIÓN...

Debido a que la leche es uno de los alimentos más completos para el ser humano ya que tiene una gran cantidad de nutrientes; de los que se pueden mencionar: carbohidratos, proteínas, lípidos (grasas), calcio, sodio, vitaminas entre otros. Lo que se contempla como un alimento ideal y necesario para humanos.

La producción de leche de vaca, es una de las ramas de la ganadería de mayor relevancia a nivel nacional, ya que no sólo se le confiere un alto valor por el tipo de alimento que aporta, si no que juega también un papel muy importante en la economía del sector primario e industrial.

La importancia de este producto se ve reflejada en el fortalecimiento de las políticas de fomento a la actividad, que se ha manifestado en la última década, al mantener una tasa media de crecimiento anual por arriba del crecimiento de la población, además de coadyuvar a la disminución de las importaciones.

La mastitis es una de las enfermedades comunes en los bovinos, ha sido señalada como una causa de la deficiencia de la producción de leche, una enfermedad subestimada ya que en los últimos años se ha reportado gran resistencia de los microorganismos que originan la mastitis en bovinos (1); del cual no se conoce un tratamiento para la provocada por *Nocardia asteroides* y como consecuencia se elimina al animal; por lo tanto afecta en las ganancias netas del productor por las pérdidas de leche y por reemplazos de ganado.

El propóleo es una sustancia resinosa, gomosa que tiene más de 20 propiedades terapéuticas, una de ellas la actividad bactericida (40), y se propone como un tratamiento alternativo de bajo costo y gran eficacia para la mastitis causada por *Nocardia asteroides*.



### **1.7 HIPOTESIS:**

Si se comprueba el efecto inhibitorio del extracto de propoleo en *Nocardia asteroides*, entonces, este se utilizara como una alternativa de tratamiento para la mastitis bovina causada por dicha bacteria

## **2. OBJETIVOS.**

### **2.1 General.**

- Determinar el efecto inhibitorio del extracto de propoleo en *Nocardia asteroides* aislada de casos de mastitis bovina, mediante el método de Moosman y microscopia electrónica.

### **2.2 Particulares.**

- Determinar el efecto del extracto de Propoleo en 8 cepas de *Nocardia asteroides*, evidenciado por el Método de Moosman.
- Determinar el efecto Bactericida/Bacteriostático, por medio del Método de Microdilución en Caldo, así como la MIC y la BCM
- Llevar a cabo Microscopía Electrónica de Transmisión para evidenciar el daño provocado por el Extracto de Propóleo en *Nocardia asteroides*, mediante la Técnica de Tinción Negativa.

### 3. MATERIAL Y EQUIPO DE TRABAJO

#### Medios de cultivo

- Base de Agar Urea de Christensen (prueba de ureasa para diferenciación de bacilos entéricos.) DIBICO.
- Agar Infusión Cerebro Corazón (para el cultivo de bacterias exigentes) BIOXON
- Caldo BHI Infusión Cerebro Corazón (cultivo de bacterias exigentes) BIOXON.

#### Material biológico

- 8 Cepas de *Nocardia asteroides*, donadas por el Laboratorio de Bacteriología Veterinaria de Campo 4 que las aisló de casos de mastitis en la cuenca Lechera de Tizayuca Hidalgo.
- Extracto de Propoleo. (recolectado de los apiarios de Campo-4)

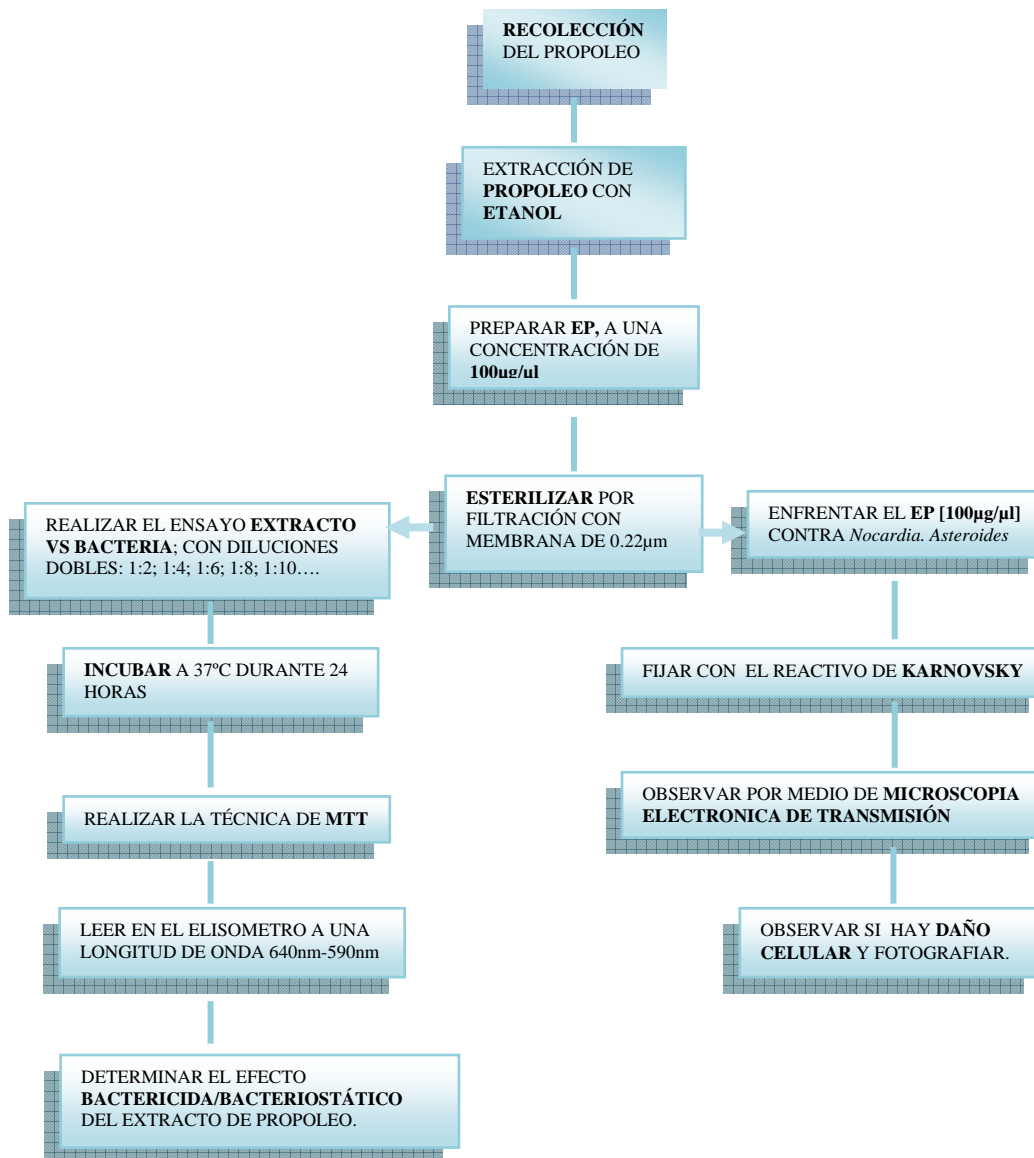
#### Reactivos

- Agua destilada
- MTT SIGMA M-2128
- Solución Salina Fisiológica

## **Equipo de trabajo**

- Horno Pasteur Ríos S.A. modelo HS-41
- Centrifuga Dynac
- Refrigerador IEM
- Estufa Ríos Rocha S.A.
- Microscopio óptico Olympus modelo CHS
- Autoclave All American Modelo 1925X
- Balanza Analítica
- Balanza granataria
- Espectrofotómetro SANOFI DIAGNOSTICS PASTEUR RX
- Parrilla con agitadores NOUVA II Stir Plate

#### 4. DIAGRAMA DE TRABAJO



## 5. METODOLOGÍA

### 5.1 Obtención del Propoleo.

Fue recolectado en el apiario por los trabajadores de la FESC-C4 en los meses de agosto y noviembre del año 2007.

#### 5.1.1 Extracción del propoleo.

Se pesaron 5 gramos de propoleo, se disolvieron en 100 ml de etanol 76% se dejó reposar durante 2 días, después se mantuvo en agitación constante por dos horas, se filtro con papel Whatman (para eliminar todas las impurezas de tamaño considerable) y con filtro millipore con membrana de 0.45  $\mu\text{m}$  se hizo pasar el extracto utilizando presión positiva.

El líquido obtenido se colocó en una botella ámbar, y se esterilizó haciéndolo pasar por un filtro estéril con membrana millipore de 0.22  $\mu\text{m}$ , se recibió el contenido en un frasco ámbar estéril y se guardo en refrigeración a 4°C.

El extracto etanólico de Propoleo se llevo a sequedad total por medio de rotavapor y horno a una temperatura no mayor de 56 °C para eliminar el disolvente.

La materia seca, se recolecto con ayuda de espátulas todo en condiciones de esterilidad, obteniéndose de 2-3 gramos de propoleo aproximadamente.

A continuación se pesó 1 gramo de Propóleo, se disolvió con 3 ml de DMSO (dimetil sulfóxido) y se llevó a un aforo de 10 ml con Solución

Salina Fisiológica estéril, lo cuál se mantuvo en refrigeración a 4°C hasta su uso.

Se realizó prueba de esterilidad al extracto de propóleo, del que se tomaron 100 µl para sembrarlos en agar Sangre e Infusión Cerebro Corazón (BHI) incubándose por 48 horas a 37°C.

Se determinó la concentración del Extracto: tomando en cuenta el peso seco del Propoleo (1 gr.), el disolvente (3 ml de DMSO) y el volumen final del extracto (10 ml), obteniendo una concentración final de **[100 mg/ml]**.

#### **CALCULOS:**

$$\frac{1000 \text{ mg}}{10 \text{ ml}} = 100 \text{ mg/ml}$$

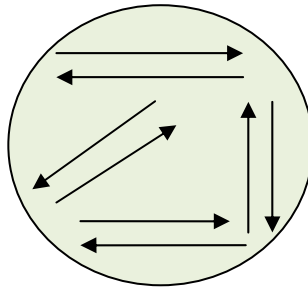
#### 5.1.2 Aislamiento de *Nocardia asteroides*.

Se utilizaron 8 cepas de *Nocardias asteroides* que fueron aisladas de casos clínicos de vacas con mastitis, procedentes de la cuenca Lechera de Tizayuca Hidalgo y posteriormente se identificaron en el Laboratorio de Microbiología en la Unidad de Posgrado de la FESC-C1

#### 5.1.3 Técnica cualitativa cilindro-placa (extracto de propoleo)

Se realizo la técnica cilindro placa de la siguiente manera:

En una caja de agar BHI se siembra en forma masiva (ver esquema 1) la bacteria *Nocardia asteroides* de 24 horas de crecimiento igualada al 0.5 del Nefelómetro de Macfarland.



**Esquema 1.** Sembrado masivo en BHI

A continuación se colocan 4 penicilindros distribuidos de manera uniforme sobre el agar BHI, colocando los compuestos como se indica en la siguiente tabla.

**Tabla 8.** Técnica de cilindro en placa (EP)

<b>PENICILINDRO</b>	<b>COMPUESTO</b>
1	EP [100 µg/µl]
2	EP [50 µg/µl]
3	DMSO
4	SSF estéril

EP: extracto de propóleo

DMSO: dimetil sulfóxido

SSF: Solución Salina Fisiológica Estéril.

A cada penicilindro se le agregó 200 µl de cada compuesto.

Por ultimo la placa se incubará a 37°C durante 24 horas.



### 5.3 Técnica cualitativa cilindro-placa (DMSO)

En una caja de agar BHI se siembra la *Nocardia asteroides* de 24 horas de crecimiento igualada al 0.5 del Nefelómetro de Macfarland. A continuación se colocan 3 penicilindros distribuidos de manera uniforme sobre el agar BHI, a los cuales se agregó los siguientes compuestos como se muestra en la tabla 9.

Tabla 9. Técnica de cilindro-placa (DMSO)

PENICILINDRO	COMPUESTO
1	DMSO reactivo analítico
2	DMSO dilución 1:2
3	DMSO dilución 1:6

DMSO: dimetil sulfóxido

A cada cilindro se le agregó 200 µl de cada compuesto.

Por ultimo la placa se incubará a 37°C durante 24 horas.

### 5.4 Ensayo extracto-bacteria.

Se realizaron los ensayos extracto-bacteria utilizando las ocho cepas de *Nocardias* crecidas en agar BHI durante 24 hrs. Posteriormente se ajustaron al estándar 0.5 del Nefelómetro de Mac Farland, para llevar a cabo el enfrentamiento con el extracto propoleo realizándose por triplicado en la microplaca de 96 pozos.

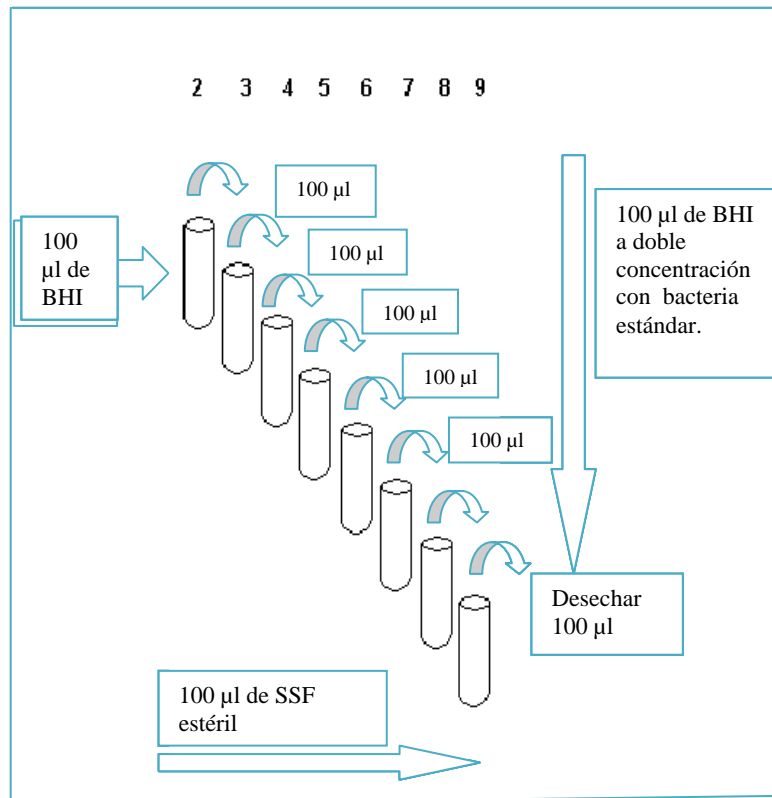
La distribución y el llenado de la microplaca para los ensayos, fue de la siguiente manera. (ver tabla 9.)

Columna	SSF, estéril (μl.)	EP (μl.)	diluciones	BHI doble concentración, c/bacteria estándar (μl.)	BHI doble concentración (μl.)
1	-----	100		100	-----
2	100	100	10 <sup>-2</sup>	100	-----
3	100	---	10 <sup>-4</sup>	100	-----
4	100	---	10 <sup>-6</sup>	100	-----
5	100	---	10 <sup>-8</sup>	100	-----
6	100	---	10 <sup>-10</sup>	100	-----
7	100	---	10 <sup>-12</sup>	100	-----
8	100	---	10 <sup>-14</sup>	100	-----
9	100	---	10 <sup>-16</sup>	100	-----
10	100	---		100	-----
11	100	---		-----	100
12	-----	100		-----	100

**Tabla 10.** Preparación de controles y problemas.

Los pozos de la columna 10, 11,12, corresponden al control +; control - y al blanco respectivamente.

De las filas de los pozos 2 al 9; se realizaron diluciones dobles del EP (ver esquema 2)

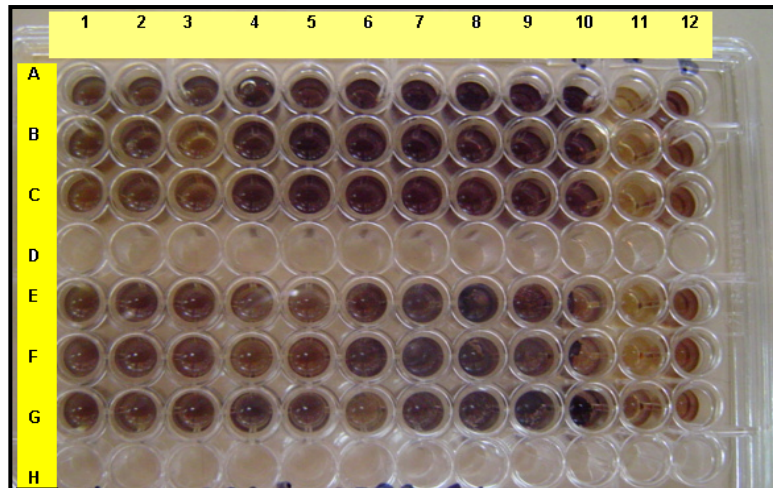


**Esquema 2.** Sistema de diluciones dobles.

De los pozos de la columna 10 solo se agregó 100 µl de SSF estéril y 100 µl de BHI a doble concentración con bacteria estándar.

A los pozos de la columna 11 se adicionó 100 µl de SSF estéril y 100 µl de BHI a doble concentración.

Y por ultimo la columna 12 se llenó con 200 µl de BHI. Por cada microplaca se probaron dos cepas de diferente aislamiento (ver imagen 13.)



**Imagen 13.** Microplaca de 96 pozos donde se realiza el ensayo extracto-bacteria.

#### 5.4.1 Método Colorimétrico de Mossman.

Las microplacas se incubaron a 37°C durante 24 horas; posteriormente se prosigue a realizar una lectura visual y con la técnica de MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-11]-2,5-difeniltetrazolio), adicionando a cada pozo 10 µl del reactivo MTT, se incuba nuevamente la microplaca durante tres horas, después de este tiempo se hace la lectura espectrofotométricamente a 570 nm de longitud de onda con un prefiltro de 610 nm. (9, 10,20)

#### 5.4.2 Ensayo bactericida – bacteriostático

Después del tiempo de incubación de las microplacas y antes de agregar el reactivo de MTT, se tomo una asada de muestra de cada pozo y se siembra en una caja de agar BHI, incubándose durante 24 horas a 37°C, se observó el crecimiento de la bacteria a diferentes concentraciones y se determino el efecto bactericida-bacteriostático.

#### 5.5 Microscopia electrónica de transmisión

- Se prepararon 50 ml de Caldo BHI a doble concentración
- Nocardia asteroides de 24 horas de crecimiento.
- Tres tubos de ensaye con capacidad de 5 ml fueron enumerados del 1 al 3.
- El tubo número 1, 2,3 será, la muestra problema, el control +, y control -, respectivamente y se prepararon como se muestra en la tabla 10.

<b>Tubo</b>	<b>BHI doble concentración c/bacteria estandarizada (ml)</b>	<b>EP (ml)</b>	
<b>1</b>	3	3	Problema
<b>2</b>	6	-----	Control +
<b>3</b>	-----	6	Control -

**Tabla 11.** Preparación de controles y problemas para MET

Los tres tubos se incubaron a 37°C durante 24 horas.

- Una vez llevada a cabo la incubación, se realizaron 3 centrifugaciones (2500 rpm/15 minutos) con SSF estéril y tres lavados desechando el sobrenadante.
- Una vez que el sobrenadante fue aclarado se desecho y se agregaron 3 ml del Reactivo de Karnovsky (ver apéndice) a cada tubo. Se dejaron reposar durante una hora, y se centrifugaron a 2500 rpm durante 30 minutos.
- Por último se eliminó el sobrenadante, y resuspendió con 3 ml de Buffer de Fosfatos (ver apéndice I).
- La muestra se ajusta a  $10^6$ - $10^7$  UFC/ml, igualado al estándar 0.5 de Mac Farland.

#### 5.5.1 Preparación de las rejillas con membranas fomvar.

- Las rejillas se lavan con acetona y se secan
- Se preparara una solución fomvar al 1% con cloroformo, si se hace con parlodion, se prepara 1% de parlodion en acetato de amilo
- En un vaso de precipitados de 1 lt limpio llenar con agua destilada
- Impregnar un portaobjetos con fomvar y dejar reposar hasta que se seque la película
- Cortar las 4 orillas del porta y sobre baño María/ con agua destilada sumergir poco a poco hasta separar la película

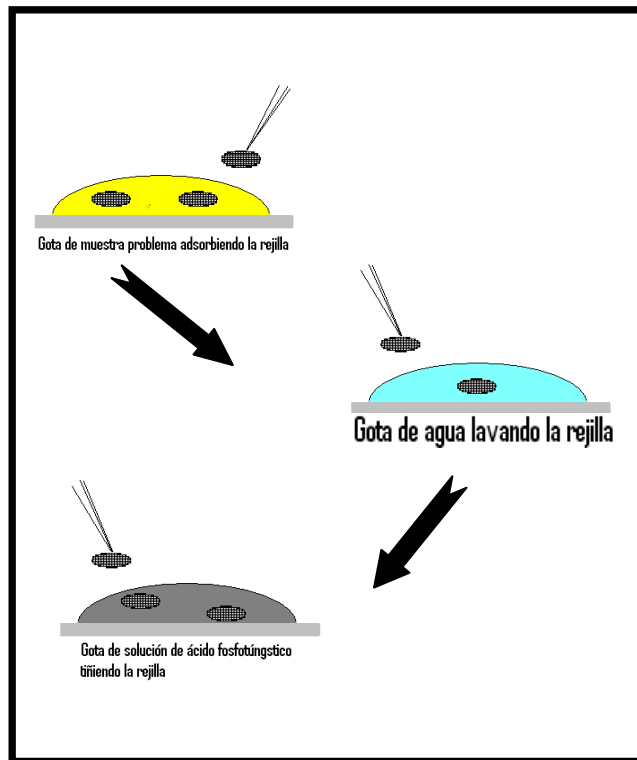
plástica (la película debe observarse de un color dorado o plateado indicando que tiene un grosor de 70-80 nm.

- ❑ Colocar las rejillas sobre la membrana y recoger con papel filtro.

NOTA. Las rejillas deben estar con membrana plástica fomvar e ionizarse mediante la aplicación de una ligera descarga.

#### 5.5.2 Técnica de Tinción Negativa

- ❑ Colocar una gota de suspensión bacteriana sobre papel parafilm y sobre ésta colocar 2 rejillas con membrana para que se adsorba la muestra durante 20 minutos (ver imagen 3)
- ❑ Quitar el excedente de la suspensión con ayuda de un papel filtro.
- ❑ Tomar las rejillas y lavarlas con SSF, el exceso de agua eliminarlo absorbiéndolo con papel filtro.
- ❑ Teñir durante 1 minuto (con ácido fosfotungstico al 2%)
- ❑ Nuevamente lavar las rejillas con SSF y absorber el exceso de colorante y secar a temperatura ambiente o en estufas a 35°C durante 20 minutos.
- ❑ La muestra esta lista para observar en el Microscopio Electrónico de Transmisión. JEOL JEM 100S, y fotografiar las muestras en las magnificaciones de 10 000 y 20 000 aumentos.



**Imagen 3.** Técnica de tinción negativa





## 6. RESULTADOS

### 6.1 Efecto del DMSO en *Nocardia asteroides* método cilindro-placa

Técnica cualitativa cilindro-placa donde se aprecia que el DMSO no influye en la actividad del propoleo sobre *Nocardia asteroides*.



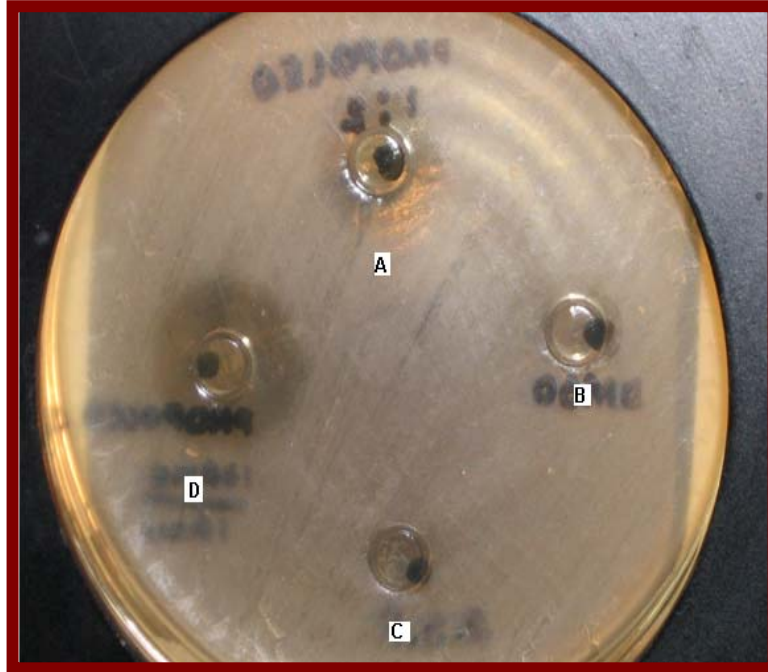
**Imagen 14.** DMSO contra *Nocardia asteroides*, el cual no tiene ninguna actividad contra dicha bacteria.

A. DMSO, reactivo analítico, B. DMSO, dilución 1:3, C. DMSO, dilución 1:9

## 6.2 Efecto del extracto de Propoleo en *Nocardia asteroides* método cilindro-placa

Se obtuvo un extracto de propoleo con calidad microbiológica.

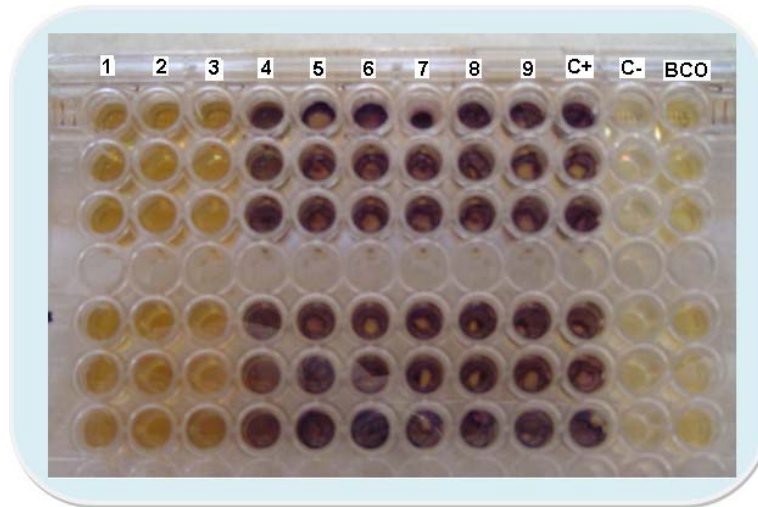
En la imagen 15 se observa una técnica cualitativa cilindro-placa del Propoleo sobre *Nocardia asteroides*, donde se aprecia claramente el efecto del extracto (A y D), no así del DMSO (B) y la SSF (C).



**Imagen 15.** Se observa que el efecto de inhibición de *Nocardia asteroides* es favorecido por el EP concentrado (A) y diluido (D).

**A:** Dilución de EP 1:2. **B:** DMSO (dimetilsulfóxido),  
**C.** SSF estéril. **D:** EP, [100 mg/ml]

En la microplaca de 96 pozos, se realizó el ensayo extracto-bacteria evidenciado por el método de Mossman, utilizando el colorante MTT, que en su forma reducida forma un precipitado púrpura, ver imagen 16.



**Imagen 16.** Microplaca de 96 pozos en la que se aprecia la inhibición de *Nocardia asteroides* por el efecto del extracto de propoleo, en los pozos de las columnas 1,2 y 3, comparados con las columnas 4-10.

En la tabla no. 11 se reportan los resultados de la media aritmética de las absorbancias obtenidas en los diversos ensayos con la técnica de MTT que fueron realizados por triplicado. Del pozo no. 1 al 9 muestran los resultados de absorbancia de la actividad de la célula a las diferentes concentraciones del EP. En la fila 10 y 11 encontramos la absorbancia del control positivo y del control negativo así como la absorbancia del blanco en la fila 12.

POZO	CEPA 1	CEPA 2	CEPA 3	CEPA 4	CEPA 5	CEPA 6	CEPA 7	CEPA 8
1	0.7607	0.8019	0.6414	0.7201	0.7201	0.7012	0.3798	0.4192
2	0.8331	0.7607	0.6512	0.7719	0.7463	0.8081	0.4528	0.4301
3	0.8416	0.8233	0.7236	0.9336	0.7936	0.9181	0.4687	0.4428
4	2.3461	2.3244	2.0759	1.7449	0.8237	1.2228	0.5401	0.4986
5	2.3911	2.5938	2.1243	1.9805	1.1404	1.3719	0.6222	0.5801
6	2.4951	2.6186	2.1359	2.1589	1.2932	1.7019	0.6688	0.5834
7	2.5052	2.6305	2.1959	2.1797	1.3333	1.8122	0.6717	0.6088
8	2.5424	2.7117	2.2888	2.1798	1.3646	1.8612	0.7593	0.6199
9	2.5872	2.7226	2.3213	2.2318	1.4074	1.9035	0.8201	0.8114
10 (C+)	2.6009	2.7801	2.5552	2.2349	1.4178	1.9511	1.5214	1.3362
11 (C-)	0.2191	0.1858	0.2638	1.6346	0.2622	0.2006	0.157	0.1142
12 (bco)	0.3545	0.3292	0.3745	0.7012	0.3774	0.4276	0.219	0.2359

**Tabla 12.** Promedio de las absorbancias a una longitud de onda de 575 nm, las cuales se realizaron por triplicado.

Para una mejor apreciación de los resultados obtenidos, fueron representados en 8 gráficos para cada una de las cepas tratadas con el Extracto de Propoleo.

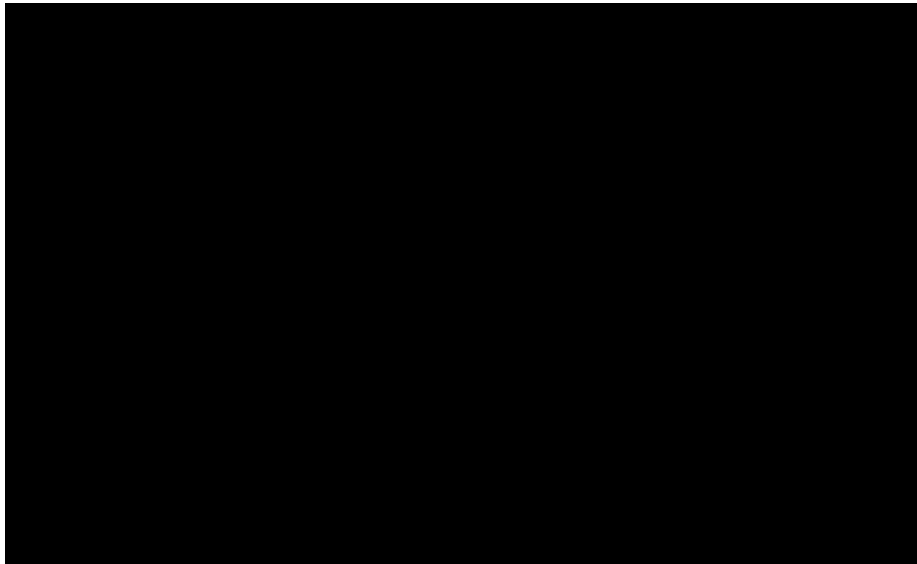
Se realizó un tratamiento estadístico (ver apéndice) utilizando una prueba de hipótesis de comparación por parejas.

### 6.3 Gráficas de la MIC del EP sobre *Nocardia asteroides*.

#### 6.3.1 Gráfica 1.

#### CEPA 1

Pozo	Abs
1	0.7607
2	0.8331
3	0.8416
4	2.3461
5	2.3911
6	2.4951
7	2.5052
8	2.5424
9	2.5872
CONTROL +	2.6009
CONTROL -	0.2191
BLANCO	0.3545

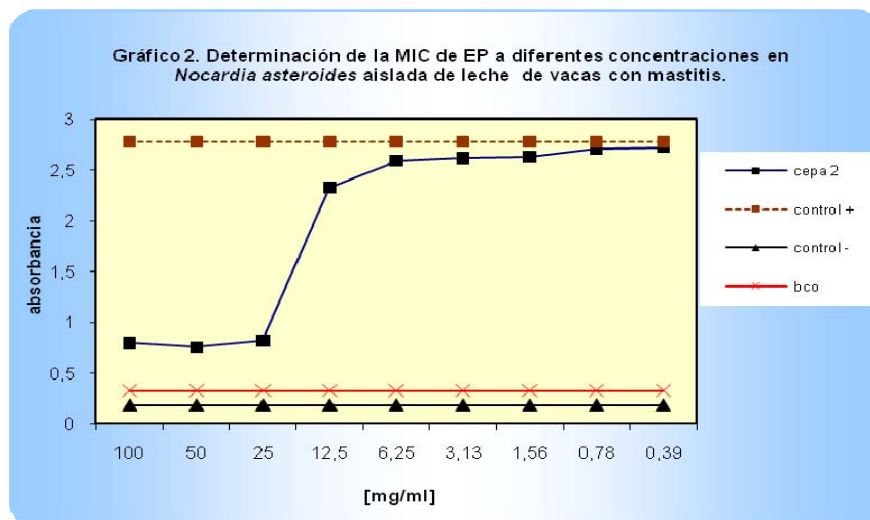


**Grafica 1.** Cepa 1 de *Nocardia asteroides*, obsérvese que a concentraciones de 25, 50, 100 mg/ml el crecimiento de la bacteria revelado por el MTT es inhibido por el extracto de propoleo.

6.3.2 Gráfica 2.

**CEPA 2**

Pozo	Abs.
1	0.7607
2	0.8331
3	0.8416
4	2.3461
5	2.3911
6	2.4951
7	2.5052
8	2.5424
9	2.5872
CONTROL +	2.6009
CONTROL -	0.2191
BLANCO	0.3545

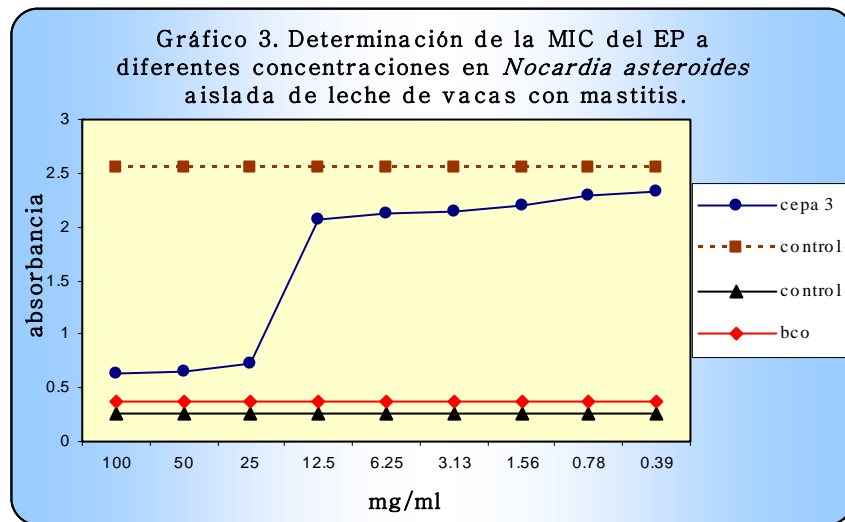


**Grafica 2.** Cepa 2, *Nocardia asteroides*. Aprecie que las Concentraciones 100, 50 y 25 mg/ml del EP repiten la inhibición del crecimiento de una cepa de diferente aislamiento

6.3.3 Gráfica 3.

**CEPA 3**

Pozo	Abs
1	0.7607
2	0.8331
3	0.8416
4	2.3461
5	2.3911
6	2.4951
7	2.5052
8	2.5424
9	2.5872
CONTROL +	2.6009
CONTROL -	0.2191
BLANCO	0.3545



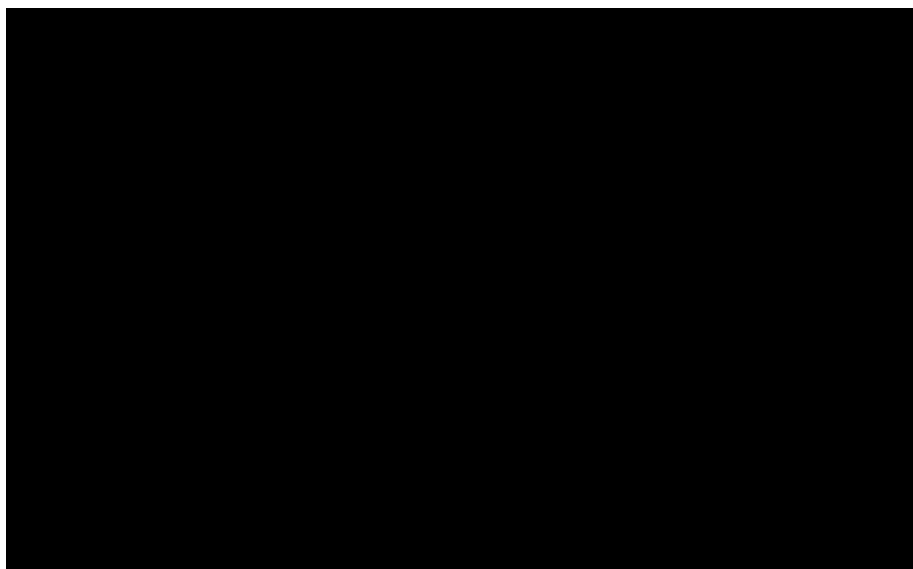
**Gráfico 3.** Cepa 3, *Nocardia asteroides*. A las mismas concentraciones el EP influye en el crecimiento de una bacteria diferente.



6.3.4 Gráfica 4.

**CEPA 4**

Pozo	Abs
1	0.7607
2	0.8331
3	0.8416
4	2.3461
5	2.3911
6	2.4951
7	2.5052
8	2.5424
9	2.5872
CONTROL +	2.6009
CONTROL -	0.2191
BLANCO	0.3545

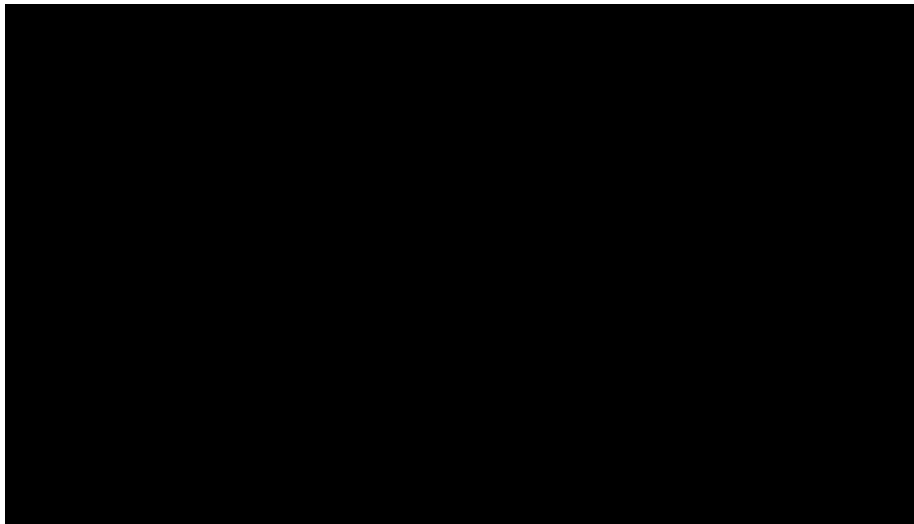


**Gráfica 4.** Se exhiben las mismas concentraciones a las cuales se muestra el efecto del extracto de propoleo sobre *Nocardia asteroides* tomando en cuenta sus respectivos controles.

6.3.5 Gráfica 5.

**CEPA 5**

<b>Pozo</b>	<b>Abs</b>
1	0.7201
2	0.7463
3	0.7936
4	0.8237
5	1.1404
6	1.2932
7	1.3333
8	1.3646
9	1.4074
CONTROL +	1.4178
CONTROL -	0.2622
BLANCO	0.3774

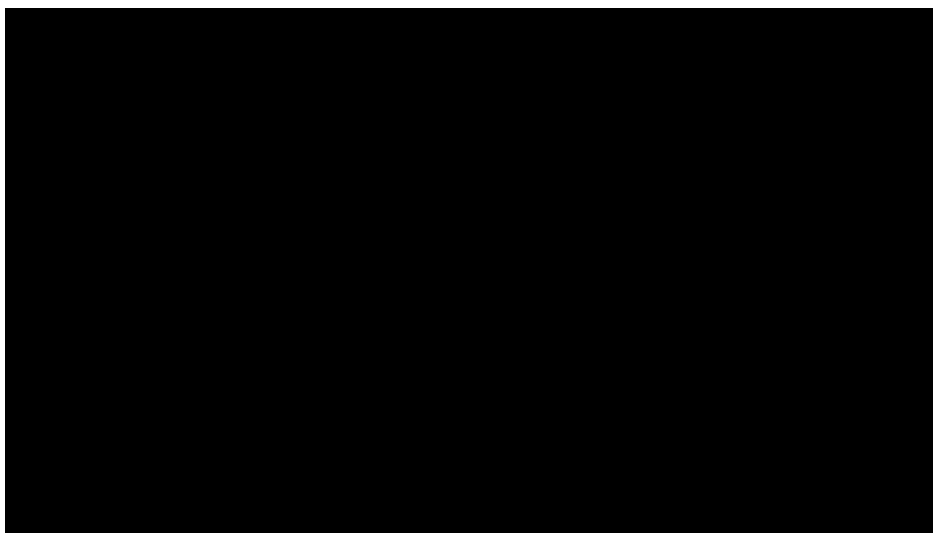


**Gráfica 5.** Nótese que a las concentraciones 100, 50, 25 mg/ml inhibe el crecimiento de la bacteria al igual que en los 4 gráficos anteriores, con respecto a sus controles.

6.3.6 Gráfica 6.

### CEPA 6

Pozo	Abs
1	0.7012
2	0.8081
3	0.9181
4	1.2228
5	1.3719
6	1.7019
7	1.8122
8	1.8612
9	1.9035
CONTROL +	1.9511
CONTROL -	0.2006
BLANCO	0.4276

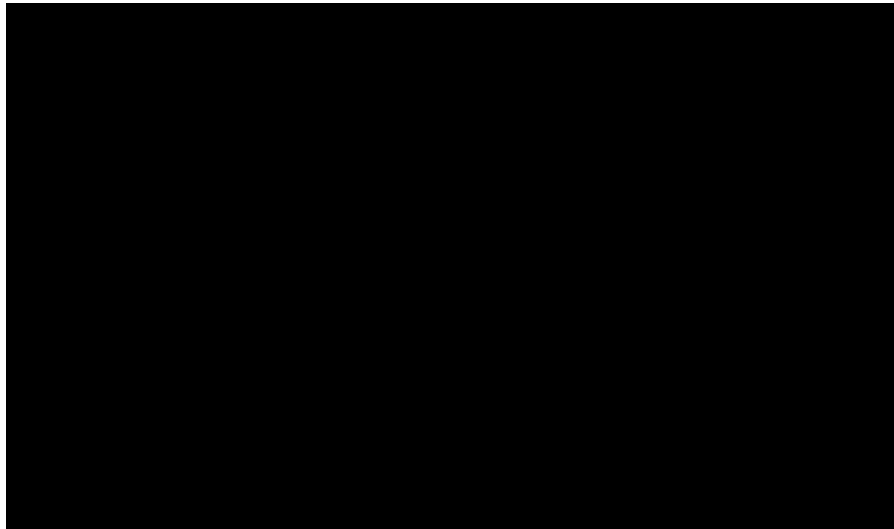


**Gráfico 6.** Se aprecia en el gráfico el crecimiento de *Nocardia asteroides* a diferentes concentraciones pero no se visualiza el efecto del extracto de propoleo con respecto a los anteriores gráficos.

6.3.7 Gráfica 7.

**CEPA 7**

Pozo	Abs
1	0.3798
2	0.4528
3	0.4687
4	0.5401
5	0.6222
6	0.6688
7	0.6717
8	0.7593
9	0.8201
CONTROL +	1.5214
CONTROL -	0.157
BLANCO	0.219

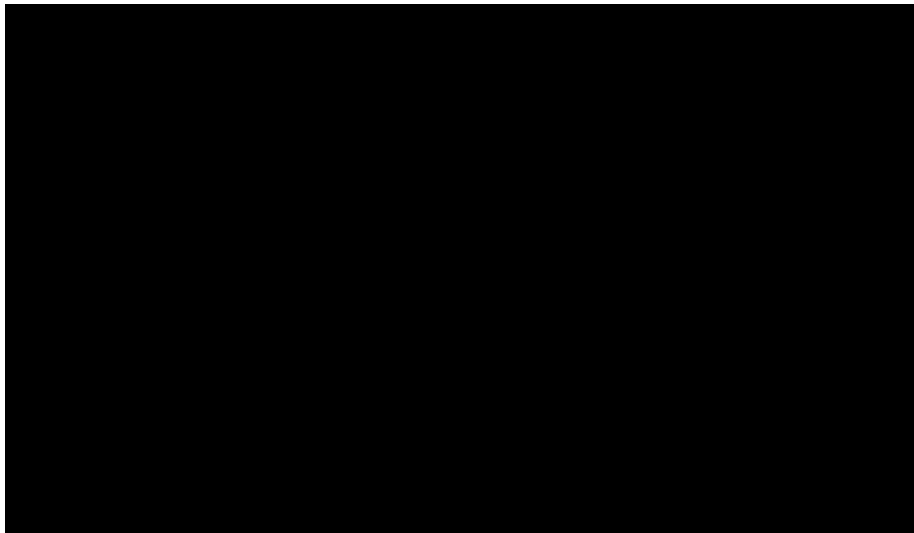


**Grafico 7.** Se observa nuevamente que el efecto del extracto de propoleo no se visualiza, y tiende a crecer la bacteria.

### 6.3.8 Gráfica 8

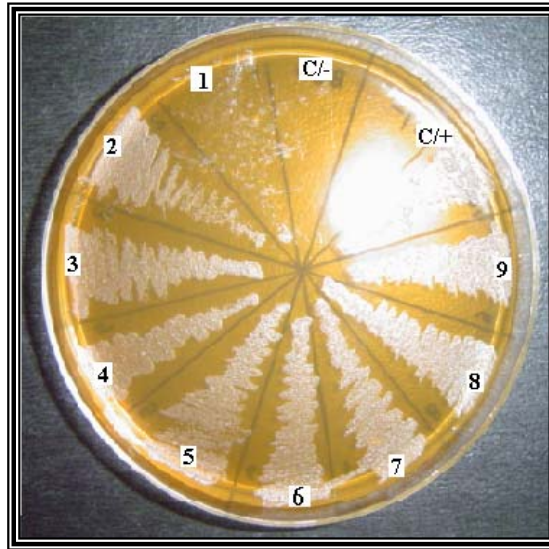
### CEPA 8

Pozo	Abs
1	0.4192
2	0.4301
3	0.4428
4	0.4986
5	0.5801
6	0.5834
7	0.6088
8	0.6199
9	0.8114
CONTROL +	1.3362
CONTROL -	0.1142
BLANCO	0.2359



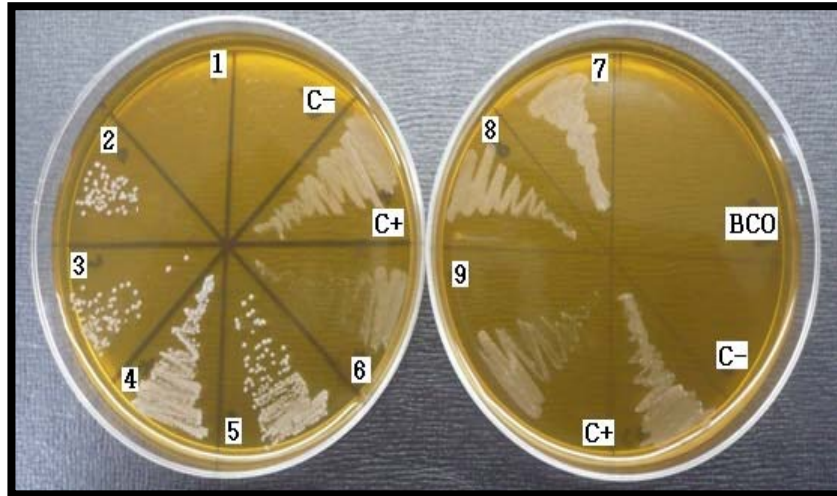
**Grafico 8.** En este grafico se muestra el crecimiento bacteriano evidenciado por la técnica de Mossman, al igual que el grafico 6 y 7 por lo que no se garantiza el efecto del EP.

**6.4 Efecto bactericida-bacteriostático del extracto de propoleo sobre *Nocardia asteroides*.**



**Imagen 17.** Efecto bactericida-bacteriostático.  
C+: control positivo, C-: control negativo, 1, 2, 3,4,...diluciones del EP

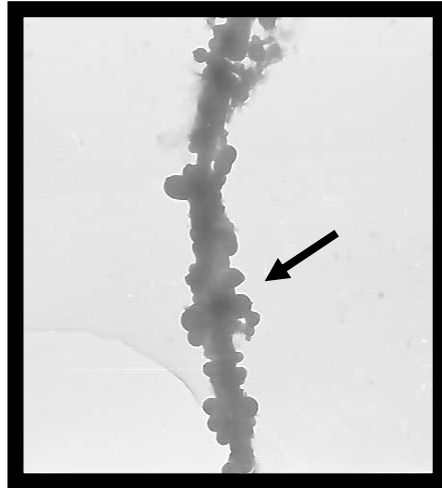
La concentración a la cual se produce un efecto bactericida es a la de 100 mg/ml (ver cuadrante 1) ya que comparado con el control positivo (C+) no hay ningún crecimiento después de ser tratada la bacteria con propoleo durante 24 horas de incubación.



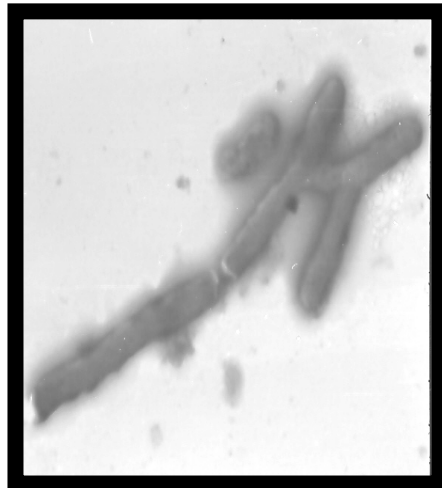
**Imagen 18.** Diluciones del EP, para apreciar el efecto bactericida-bacteriostático.

Se aprecia el efecto del EP, donde podemos observar que en el cuadrante 1 presenta la acción bactericida, no así en el cuadrante 2 donde se considera la CMB, mientras que la inhibición de la bacteria empieza desde el cuadrante número 3. Estos tres cuadrantes representan los tres pozos que no reducen el MTT, por lo tanto hay inhibición en el crecimiento bacteriano.

## 6.5 Microscopia Electrónica de Transmisión



**Fotografía 1**, imagen de Microscopia Electrónica de Transmisión con tinción negativa (10 000 magnificaciones), *Nocardia asteroides* tratada con EP, nótese las protuberancias o formas esféricas, o en tal caso la secreción de vesículas. La pared de la bacteria es irregular.



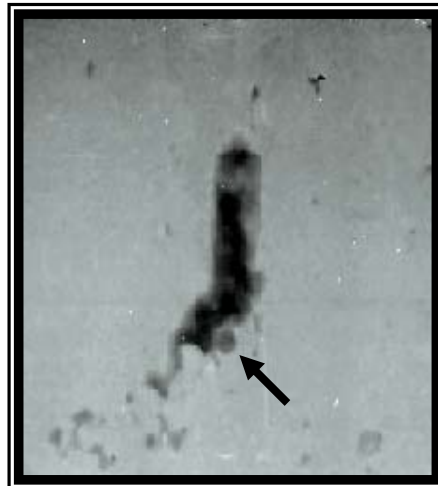
**Fotografía 2**, imagen de Microscopia Electrónica de Transmisión con tinción negativa (10 000 magnificaciones), *Nocardia asteroides* control, morfología bacilar típica, se observa una estructura perfectamente definida, y no hay alteración en la pared celular.



### Microscopia Electrónica de Transmisión.



**Fotografía 3.** Imagen de Microscopia Electrónica de Transmisión con tinción negativa (15 000 magnificaciones), *Nocardia asteroides* control, nótese al bacilo con pared celular bien definida y sin daño aparente.



**Fotografía 4.** Imagen de Microscopia Electrónica de Transmisión con tinción negativa a (10 000 magnificaciones), *Nocardia asteroides* con tratamiento, nótese el efecto por la formación de protuberancias o formas esféricas.

## 7. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

### **Problemática de la extracción del propoleo.**

Para la obtención del propoleo crudo, se tienen que adoptar algunas técnicas de extracción, en algunos artículos <sup>(22)</sup> se extrae solamente los principios activos como por ejemplo los flavonoides que se obtienen a partir de extracciones con disolventes como el cloroformo ya que solamente se interesan por la actividad antimicrobiana de estos componentes, pero en México la Organización Nacional de Apicultores <sup>(40)</sup> informa que el extracto se tiene que congelar durante una noche, triturar hasta obtenerlo como un polvo fino, macerar con etanol y dejarlo a temperatura ambiente y en oscuridad durante 7 días. Pensamos que el tiempo de concentración del extracto es demasiado prolongado y que algunos de sus principios activos pueden verse afectados perdiendo sus propiedades biológicas. En nuestro proyecto solo concentramos el propoleo con etanol durante 3 días, después de este tiempo se eliminó el disolvente, Enzo A. et. al, en el 2006 <sup>(22)</sup>, reporta los diferentes propóleos recolectados en distintas áreas, donde menciona que presentan diferentes solubilidades en etanol, esto confirma lo dicho por Li-Chang-Lu et al, en el año 2003, donde determina que el efecto del extracto etanólico de propoleo va a depender de la región y el tiempo en que se recolecta este producto. <sup>(39)</sup> Los países tienen un clima diferente, así como la flora y la fauna, por lo que el propoleo de cada país es diferente en su composición y se espera que sea diferente la solubilidad de sus componentes. No todos los artículos que se consultaron en este proyecto explican el método de extracción empleado, solamente describen como se aplica a los ensayos

el propoleo, utilizando mezclas como etanol.-propoleo, cloroformo-propoleo, entre otras.

Una vez separado el etanol del propoleo se peso 1 gr. del compuesto (materia seca) y fue necesario disolverlo en 3 ml de DMSO llevándolo a un aforo de 10 ml con SSF estéril, cuando se le agrego la solución salina fisiológica, el concentrado se precipitó, y nos hace cuestionar acerca de los componentes del extracto de propoleo solubles en etanol (2,11,22,,39) cabe mencionar que los compuestos que se disuelven en etanol, la mayoría de ellos también lo pueden hacer en agua, pero hay otra parte la cual no pueden ser disueltos mas que en etanol, se pudo observar, que en presencia de agua se precipita el propoleo, y nos dimos cuenta que estos componentes que se perdieron en la precipitación ya no quedan diluidos en el extracto porque para obtenerlo estéril, fue necesario pasar esta solución por una membrana de 0.22  $\mu\text{m}$ , recibiendo el contenido en un frasco ámbar estéril, y todo lo que se precipito quedo sobre la membrana, obteniendo un líquido amarillo y con buena presentación farmacéutica.

El propoleo puede ser disuelto por muchos compuestos como etanol, alcohol isopropilico, glicerol, cloroformo, éter, inclusive agua, pero es muy importante señalar que en estos disolventes siempre hay una parte del propoleo que no se va a poder disolver debido a la naturaleza de sus principios activos. Y si se realizan ensayos extracto bacteria y se toma una lectura de absorbancia como los desarrollados en este proyecto se dará una lectura no confiable por la presencia del precipitado por lo tanto no es posible obtener un resultado veraz.

Por ello es imprescindible conocer cual es el comportamiento del propoleo en cada uno de estos disolventes, y elegir el mejor de ellos para realizar la extracción.

Si el propoleo crudo se hubiera obtenido comercialmente, estos productos ya vienen estandarizados, se tendría que seguir una metodología, para preparar el extracto y aplicarlo en los ensayos, pero ante eso, no contaríamos con la información de como fue la extracción, probablemente fue mezclado con otros componentes ajenos a su naturaleza para darle mas potencia biológica al extracto no tendríamos conocimiento de donde es su origen, o puede que nos aconsejen los proveedores a consumir mas extracto crudo para tener resultados satisfactorios, sin ser necesario, con la finalidad de que yo adquiriera mayor producto y los proveedores mejores ganancias .

Muchos microorganismos tienen la propiedad de resistir a diferentes fármacos <sup>(13)</sup>. Por esta razón nos interesaron los productos naturales y nos damos a la tarea de buscar nuevos compuestos en ellos, capaces de tener propiedades antimicrobianas, que a futuro sirvan como tratamientos alternativos.

La mastitis bovina causada por *Nocardia asteroides*, no es muy común en las vacas, por lo que no existe una terapia eficiente. Y los fármacos que se dan como tratamiento no son capaces de controlar la infección y es necesario eliminar al animal.

Esta enfermedad donde los medicamentos no han tenido éxito y provoca grandes pérdidas económicas, por ello es necesario investigar más sobre los principios activos de los compuestos naturales para crear alternativas de tratamiento.

A pesar de que existen reportes previos (28, 36, 39,54) donde se evalúa la actividad biológica del extracto de propoleo sobre *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Escherichae coli*, *Prevotella*, *Clostridium*, *Enterococcus*, entre otros. Se realizó la búsqueda de información bibliográfica acerca del efecto del extracto de Propoleo en *Nocardia asteroides*, y hasta el momento no hay ningún reporte, por lo que no hay referencias para poder discutir de forma directa la información obtenida en este proyecto, y consideramos que esta tesis es una de las primeras investigaciones realizadas en el país.

Se utilizaron 8 cepas de *Nocardia asteroides* que fueron donadas por el Laboratorio de Bacteriología Veterinaria de la FESC C-4, las cuales fueron aisladas e identificadas de casos de mastitis en la Cuenca Lechera de Tizayuca Hidalgo. Posteriormente se identificaron en el Laboratorio de Microbiología de la Unidad de Posgrado de la FESC-1, realizando pruebas Bioquímicas como: Gram, catalasa, oxidasa, NO<sub>3</sub>, Urea de Christensen y una tinción de BAAR para saber si nuestra bacteria es acidorresistente o “parcialmente acidorresistente”. (32,42) y consideramos que estas cepas no son Ácido Alcohol Resistentes, debido al tiempo que tienen de haber sido aisladas y sobre todo, por el proceso de conservación ha hecho que pierdan la capacidad de teñirse y de no retener el colorante o simplemente es una bacteria no ácido alcoholrresistente..

El estudio del efecto del extracto de propoleo en las 8 bacterias nos ha hecho pensar, para que se obtengan resultados de mayor confiabilidad, proponemos trabajar con una mayor población de cepas de *Nocardia*, ya que de las 8 cepas trabajadas solo 5 de ellas se observa, el marcado

efecto inhibitorio del Propoleo, pero si tuviéramos una mayor población se tendría uniformidad en los resultados.

Martínez U. en Mayo del 2008 y Quintero M. et al, (2007), también recolectan el propoleo de los apiarios de la FESC C-1 para conocer el efecto antifúngico del extracto etanólico de propoleo sobre *Candida albicans*. (40,51)

En las referencias antes mencionadas se extrae y se utiliza al propoleo con etanol (a diferentes grados), así como lo describen otros artículos (2, 11, 22, 39). En nuestro trabajo solo se extrae con etanol y se evapora en una estufa a 56 °C para eliminarlo, debido a la actividad del etanol sobre las bacterias para que este no influya en el efecto del propoleo sobre *Nocardia asteroides*.

Este extracto se disolvió con DMSO y SSF estéril, en una relación 1:10. A continuación se realizaron técnicas cualitativas de cilindro en placa. La primera técnica corrobora el efecto del DMSO diluido y concentrado, donde no presenta ninguna actividad en las 8 cepas de *Nocardia asteroides* como se muestra en la imagen 14. La segunda nos sirve para saber a que concentración se iniciara y se realizaran diluciones dobles para encontrar la MIC, como se observa en la imagen 15, donde la concentración ideal de trabajo y se aprecia el efecto de inhibición es de [100 mg/ml]. Con esta metodología tenemos la confianza de que se están eliminando variables que en algún momento pudieran influir en la actividad del extracto, sobre todo sabemos que la actividad biológica del EP solamente es debido a sus principios activos.

Con el fin de evaluar la actividad del propoleo en las cepas de *Nocardia asteroides*, se utilizó la técnica de microdilución en placa, en previos estudios el efecto del propoleo se evalúa llevando a cabo técnicas como: difusión en agar (método Kirby Bauer), dilución en agar o dilución en caldo <sup>(2,11,22,39)</sup> pero la microdilución tiene ventajas, una de ellas: es que podemos utilizar volúmenes pequeños de reactivos de un modo simple y económico <sup>(53)</sup>, además esta técnica es la mas adecuada para trabajar en el Laboratorio de Microbiología y de la que se han tenidos resultados satisfactorios, aunque no es por demás mencionar que éste método nos proporciona resultados cuantitativos y cualitativos y sobre todo que se pueden complementar entre sí.

En artículos previos <sup>(9,20)</sup> utilizan la técnica de Moosman ya que es un ensayo colorimétrico basado en la capacidad de las enzimas deshidrogenasas de las células viables para transformar la sal MTT tetrazolium a MTT formazan <sup>(68)</sup>, por medio de esta técnica se ha determinado el efecto citotóxico de algunos extractos sobre líneas celulares <sup>(10)</sup> o las CMI sobre bacterias como *Helicobacter pylori*, *Streptococcus grupo A*, *Escherichae coli* <sup>(20)</sup> entre otras, obteniendo resultados importantes. Apoyándonos en este fundamento, y sabiendo que las bacterias producen este tipo de enzimas, necesarias para generar ATP, donde la reacción es simple y por lo tanto el, MTT (oxidado) de color amarillo pasa a la forma MTT formazan (reducido) originando un precipitado púrpura <sup>(17,68)</sup> ver figura 16, podemos interpretar que la bacteria se encuentra viable a partir del 4° pozo ya que está produciendo las enzimas capaces de transformar al colorante, posteriormente se tomó lectura en un Espectrofotómetro a una longitud

de onda de 575 nm con un filtro de referencia de 610 nm (10, 17, 20, 46), donde la intensidad del colorante será proporcional al número de bacterias vivas presentes. (10, 17, 68)

Se realizó un tratamiento estadístico<sup>(28)</sup> a las absorbancias obtenidas en la lectura, mediante el método de comparación por parejas, en el cual se proponen pruebas de hipótesis, donde la hipótesis nula (H<sub>0</sub>) fue rechazada, por lo tanto nos indica que es efectivo el tratamiento del Extracto de Propóleo sobre *Nocardia asteroides*

Los resultados cuantitativos obtenidos se muestran en el gráfico 1-5, donde se aprecia que el efecto de inhibición empieza en el pozo 3 (25 mg/ml), 2 y 1, cualitativamente se observa transparente el caldo en estos pozos comparados con la turbidez de los pozos restantes y del control positivo, antes de ser agregado el MTT a la microplaca. El EP inhibe a las mismas concentraciones a 5 cepas, que son las que se visualizan en los graficas 1-5. Por lo tanto la MIC es de 25 mg/ml. Las gráficas 6, 7, 8 no se aprecia el efecto de inhibición por lo que no se puede determinar una MIC, ya que la bacteria se comporta de una manera diferente a las demás. Pero a una concentración de 100 mg/ml se obtuvo el efecto bactericida ya que no hay ningún crecimiento de la bacteria, después de haberlas tratado durante 24 horas con el EP.

Martínez U. C (2008) reporta la MIC de propóleo en *Candida albicans* ATCC 10231, de 0.6 mg/ml y un efecto bactericida de 0.8 mg/ml a partir de la 5<sup>a</sup> hora mediante una curva de crecimiento, Barrios C. G. 2008 (datos preliminares) informa la MIC's de *Staphylococcus aureus* 6.25 mg/ml, *Streptococcus agalactiae* 50 mg/ml,



*Staphylococcus epidermidis* 25 mg/ml, *Pseudomonas putida* 12.5 mg/ml, *Escherichae coli* 6.25 mg/ml, así como Ling Chang Lu et al 2007, , donde la MIC de propoleo para *Staphylococcus aureus* es de 3.75 µg/µl a 60 µg/µl. Otras fuentes mencionan la MIC de bacterias patógenas orales de 4-512 µg/ml (36). En investigaciones previas reporta la MIC de 30.2 mg/ml de *Escherichae coli* (63), o la actividad del propoleo rojo de Brasil en *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 donde la MIC es de 25-50 µg/ml (59)

Es importante señalar que la MIC reportada en tesis y artículos (2, 11, 22, 39, 40, 51) son concentraciones mucho menores que la MIC de propoleo para *Nocardia asteroides*, esto puede deberse a que en estas publicaciones evalúan la actividad biológica utilizando técnicas diferentes, así como las extracciones, debido a que son muy complejas se llevan a cabo por infinidad de compuestos (como hexano, cloroformo; (22, 39) etc.) , para los investigadores de otros países influye mucho el mes del año en que se recolecta el producto, otros extraen los componentes mayoritarios y minoritarios y analizan la actividad por separado o realizan sinergismo entre los principios activos y se evalúan con las bacterias de interés, y una de las principales, el área del lugar en que se recolecta incluyendo a la flora, que es completamente diferente entre países, por lo que se tendrían resultados diferentes pero hasta cierto punto semejantes, inclusive la MIC reportada por Martínez Urbán C. (2008), aunque la recolección fue del mismo lugar y utilizamos el mismo compuesto, la extracción y la disolución de este fue de manera diferente.

También no es por demás señalar que *Nocardia asteroides* es una bacteria diferente a las que han estudiado y han reportado en los

artículos o tesis, a pesar de que es una bacteria Gram +, posee una pared celular única y típica que se compone en mayora parte por ácidos micólicos, <sup>(13)</sup> por ello pertenece al grupo CMN. <sup>(13)</sup> Por eso creemos que la forma de extracción y por el tipo de pared celular de la bacteria se refleja en la MIC y esta concentración sea mayor a la reportada en dichas investigaciones, pero necesaria y efectiva para poder inhibir el crecimiento de *Nocardia asteroides* o para causar la lisis de la bacteria. Se espera que a partir de esta información se realicen más investigaciones del efecto del EP en *Nocardia asteroides*, para que así se puedan comparar la MIC y así establecer límites y que sirva para crear o producir algún fármaco.

El efecto Bactericida-Bacteriostático, se determinó por el enfrentamiento del EP con la bacteria durante 24 hrs, después de este tiempo como se observa en la figura 17-18, donde se pueden ver dos tipos de efectos, bactericida a una concentración de 100 mg/ml, y bacteriostático (25 mg/ml), reportando de igual manera la MBC de 50 mg/ml. Otra forma de evaluar este efecto es mediante una curva de crecimiento como se comenta en dichos reportes. El efecto del extracto de propoleo puede ser bactericida o bacteriostático dependiendo de la concentración del extracto, que a su vez va a estar influenciado por el método de extracción <sup>(49)</sup>

Una forma de evaluar el efecto del extracto de Propoleo en las cepas de *Nocardia asteroides* fue observado por la Microscopia Electrónica de Transmisión <sup>(67)</sup> para poder precisar si hubo algún daño provocado en la bacteria. Para llevar a cabo la Microscopia Electrónica de Transmisión se utilizó la técnica de Tinción Negativa, en la cual solo se

observa la morfología de nuestra bacteria, y nos sirve para visualizar los cambios de la forma de la bacteria a consecuencia del Propoleo.

Morales S. en el 2002, habla del daño producido por *Caléndula officinalis* en *Pseudomonas aeruginosa*, menciona los resultados de Microscopia Electrónica de las bacterias tratadas, con deformidades en su estructura, protuberancias en formas esféricas, y los define como esferoplastos que son estructuras formadas a partir de la hidrólisis del peptidoglicano, inclusive compara el mecanismo de acción de la *Caléndula officinalis* como al de penicilina <sup>(46)</sup>.

En nuestros resultados de Microscopia Electrónica de Transmisión que obtuvimos, las bacterias tratadas con el EP revelan un daño en su pared celular como se aprecia la fotografía 1, pero no podemos garantizar que estas estructuras sean las denominadas protoplastos <sup>(46)</sup>, ya que solamente la penicilina es la única en producir este tipo de efecto, además nuestra bacteria de trabajo produce lisozimas que inhiben la actividad de los  $\beta$ -lactámicos. Solo podemos apreciar que hay cambios importantes en la estructura de la bacteria, la pared celular es irregular comparada con la pared celular de la bacteria control ver fotografía 2 y 3, tiene formas esféricas, inclusive las protuberancias descritas en el trabajo ya mencionado, son muy parecidas a las que se observan en la fotografía 1, o también se puede plantear que la bacteria tratada esta secretando vesículas (ver fotografía 1), como una respuesta a la agresión del Propoleo.

Pero también Martínez U. en mayo del 2008 reporta, la utilización de técnicas tinción y de fluorescencia como DAPI, azul de toluidina,

bromuro de etidio y gram, con la finalidad de evaluar el daño en la estructura de *Candida albicans* ATCC 10231 por el Extracto Etanólico de Propoleo. Para complementar y reforzar estos resultados que se obtuvieron en la MET sería interesante realizar estas técnicas las cuales nos arrojen a otros datos importantes y así realizar un análisis mas completo. Como el Gram que pude ser fundamental para la observación de la morfología bacteriana, y saber si el peptidoglicano es capaz de retener el cristal violeta después de ser tratado con Propoleo.

También realizar la tinción de Bromuro de Etidio el cual, Martínez Urban C. Consideraba al las levaduras dañadas como aquellas que presentaran una intensidad de fluorescencia menor que el control., así como la tinción de DAPI donde determinó que las levaduras dañadas, presentaron un aumento de tamaño del núcleo y con intensidad de fluorescencia mayor que el control.

A pesar de que estas técnicas nos puedan dar información acerca del daño causado en la bacteria como en la pared celular, la membrana o el núcleo, también hay que poner de manifiesto que si se usa un extracto Etanólico, probablemente este repercutirá en la estructura bacteriana, desgastando algunos componentes que hay en la pared o la membrana celular, y no permite que estos puedan interactuar de una forma normal con los colorantes de la tinciones, como los resultados que informa Martínez U., donde las levaduras control se observan perfectamente teñidas mientras que las tratadas con EEP se tiñen débilmente con respecto al Gram, al azul de toluidina entre otras.

No es por demás decir que la Microscopia Electrónica de Transmisión fue una herramienta de mucha utilidad en esta investigación, sabemos que cuantitativamente hay daño, y se pudo analizar con gráficos e imágenes, pero cualitativamente las imágenes tomadas en el Microscopio nos da un amplio panorama acerca de lo que esta pasando en la estructura de la pared de la bacteria

El propoleo es un producto de origen 100 % natural, y muchos científicos han estudiado sus propiedades y han reportado su actividad contra bacterias de interés clínico que causan enfermedades importantes en el humano, sin embargo también podemos canalizar estos conocimientos para el estudio de nuevos fármacos en la medicina veterinaria, y por ello debido a los resultados obtenidos en este proyecto nos consideramos los pioneros para sentar las bases y proponer en un futuro a este compuesto como un antibiótico eficiente y considerarlo como una alternativa de tratamiento para la mastitis bovina, no solo para la que provoca Nocardia si no para todos los microorganismos que causen dicha enfermedad.

## 8. CONCLUSIONES

- ❑ Se evaluó el efecto antimicrobiano del EP sobre *Nocardia asteroides*.
- ❑ Se determinó que el EP presenta actividad Inhibitoria y Bactericida solamente en 5 cepas de *Nocardia asteroides* y no presenta ninguna actividad contra las tres restantes.
- ❑ Por medio de la técnica de Microdilución en Caldo se logró determinar para el EP la concentración Mínima Inhibitoria fue de 25 mg/ml y una Concentración Mínima Bactericida de 50 mg/ml respectivamente para *Nocardia asteroides*.
- ❑ A la concentración de 100 mg/ml el efecto es bactericida sobre 5 cepas de *Nocardia asteroides*.
- ❑ Por medio de la MET se pudo observar el daño celular que provoca el EP sobre *Nocardia asteroides*, empleando la técnica de tinción negativa.

## 9. SUGERENCIAS

- ❑ Como el propoleo es considerado un antimicrobiano de amplio espectro se sugieren mas estudios *in vitro* sobre una población de bacterias gram + y gram-
- ❑ Se propone el estudio del efecto tóxico del extracto de propoleo en líneas celulares.
- ❑ Se sugiere la extracción y separación de los principios activos del propoleo utilizando diferentes solventes.

## 10. APENDICE

### 10.1 Análisis estadístico de comparación por parejas.

cepa	1	2	3	4	5	6	7	8
abs (CMI)	0,7607	0,8019	0,6414	0,7201	0,7201	0,6625	0,3798	0,4192
abs. (C+)	2,6009	2,7801	2,5552	2,2349	1,4178	1,9511	1,5214	1,3362

abs: absorbancia, CMI: Concentración Mínima Inhibitoria, C+: control positivo.

Absorbancias de cepas de *Nocardia asteroides* sin tratamiento(A) y con tratamiento (D) del Extracto de Propoleo.

Notese que:

$$\bar{d} = D - A$$

<b>A:</b>	2.6009	2.7801	2.5552	2.2349	1.4178	1.9511	1.5214	1.3362
<b>D:</b>	0.7607	0.8019	0.6414	0.7201	0.7201	0.6625	0.3798	0.4192
<b>Di</b>	-1.8402	-1.9782	-1.9138	-1.5148	-0.6977	-1.2886	-1.1416	-0.917
$\Sigma di$	-1.4161							
$\Sigma di^2$	17.5483							

¿Proporcionan los datos la evidencia suficiente para concluir que el tratamiento de las cepas de *Nocardia asteroides* con el Extracto de Propoleo es efectivo en la inhibición del crecimiento?

$$\Sigma di^2$$



Se puede decir que existe la suficiente evidencia para concluir que el tratamiento con el EP es efectivo, si es posible rechazar la hipótesis nula que indica que el cambio de en la media poblacional  $\mu d$  es cero o positivo.

Los datos son las absorbancias de las 8 cepas con tratamiento y sin tratamiento.

1. Las diferencias que se observan forman la muestra aleatoria simple extraída de una población de diferencias con distribución normal que podrían ser generadas bajo las mismas circunstancias.

2. Hipótesis: la hipótesis nula y alternativa son las siguientes:

$$H_0: \mu d \geq 0$$

$$H_1: \mu d < 0$$

4. Si la hipótesis nula es verdadera, la estadística de prueba sigue una distribución t de *Student* con n -1 grados de libertad.

5. Sea  $\alpha = 0.5$  el valor crítico de t es -1.7959. Se rechaza  $H_0$  si el valor calculado de t es menor que al valor crítico.

6. A partir de las diferencias de  $d_i$ , se calculan las siguientes mediciones.

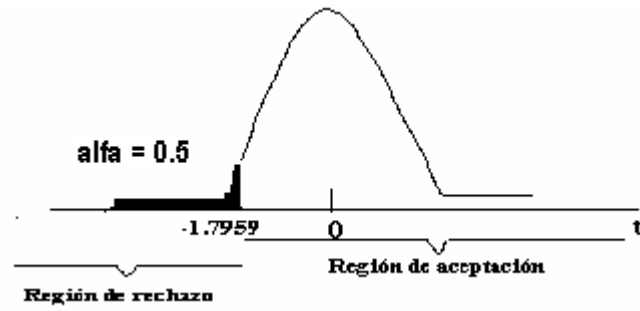
$$\bar{d} = \frac{\sum d_i}{n}$$

$$s_{\bar{d}}^2 = \frac{\sum (d_i - \bar{d})^2}{(n-1)} = \frac{n \sum d_i^2 - [\sum d_i]^2}{n(n-1)}$$

$$s^2 d = 2.4711$$

$$t = -2.5794$$

7. Se rechaza  $H_0$  porque  $t = -2.5794$  está en la región de rechazo
8. Se puede concluir que el tratamiento del EP es efectivo.



## 10.2 Preparación de reactivos

### MTT

Disolver MTT en RPMI-1640 rojo de fenol, hasta una concentración de 5mg/ml.

Filtrar con membrana de 0.22  $\mu$ m.

Guardar a una temperatura de 4°C, hasta su uso.

### SSF estéril

Por cada 100 ml de agua destilada agregar 850 mg de NaCl.

Esterilizar en autoclave a 121°C, 15 libras de presión, durante 15 minutos.

### ACIDO FOSFOTUNGSTICO.

El ácido fosfotungstico es una solución al 2% ajustada al pH deseado mediante NaOH 1N.

### GLUTARALDEHIDO

**Buffer:** Sol. A  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.2 M 35.61 g

Disolver en agua destilada hasta un volumen final de 1000 ml

Sol. B  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.2 M 31.21 g

Disolver en agua destilada hasta un volumen final de 1000 ml

Para preparar 50 ml de solución amortiguadora pH = 7.2, 0.2 M  
mezclar:

36 ml de sol. A + 14 ml de sol. B

Fijador: 50 ml de amortiguador de fosfatos al 0.2 M

6 ml de glutaraldeído en agua al 25 %

44 ml de agua destilada

Concentración final del aldehído de 1.5 %

---

**11. REFERENCIA BIBLIOGRAFICA**

1. <http://www.sagarpa.gob.mx/Dgg/estudio/sitlech04.pdf>
2. Alencar SA., Oldoni T.L.C., Castro M.L., Costa-Neto C.M., Ikegaki M. 2007. **Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis.** Journal of Ethnopharmacology 113 278-283
3. Ávila TS; Gasque G.R., Cano C.P., Baños C.A., Fuentes H.V. 1993. **Frecuencia de manual de mastitis clínica y sus costos en una explotación del valle de Mexico.** Memorias del Congreso Nacional de Buiatria. Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en bovinos, 1993: 239-234
4. Bankova VS, Cristov R, kujungiev A, Marcucci MC, Popov S. 1995. **Chemical composition and antibacterial activity of Brazilian Propolis.** Z. Naturforsch, vol: 50:167-172
5. Bankova VS. 2000. **Determining quality in propolis samples.** J. Am Aphiter;7:2
6. **BankovaV.,(2005).Recent trends and important developments in propolis research.** eCAM; 2 (1): 29-32
7. Banskota, AH., Nagaoka T., Sumioka, LY., Tezuka YA. **Antiproliferative activity of the Netherlands propolis and its active principles in cancer cells lines.** J. Ethnopharmacology , 80: 67-76
8. Biberstein L. Ernst, Cheng Zee Yuan. 1990. **Tratado de microbiología veterinaria,** Editorial Acribia S.A, Zaragoza-España. pag 82.
9. **Biochemicals organic compounds.** For Research and Diagnostic Reagents, ZIGMA 1994, pag. 1625
10. Bolaños U. I., Yañez L.C.G. (2007). **Efecto promotor en líneas celulares (BHK-21, VERO, HELA, HEP-2 y RD) por extractos de *Caléndula officinalis*.** Pag. 25
11. Bombarda de AF., Aparecido T.S., Brando G.R. (2007). **Antimicrobial effect of propolis and other substances against selected endodontic pathogens;** 104:709-716
12. Burdock GA. 1998. **Review of the biological properties and toxicity of bee propolis.** Food Chem Toxicology ; 36: 347-363.

13. Carter G.R; Ghengapra M.M. (1991). **Bacteriología y micología veterinarias: aspectos esenciales.** Manual Moderno 2a edición, México-Bogotá, pag 152
14. Castaldo S, Capasso F. **Propolis and old remedy used in modern medicine** *Phytotherapie* 2002, 73: 1-6.
15. Ciane, EE. (1997). **The past and present importance of bee products to man. Bee of products: properties, applications, and aphiterapy** plenum press. New York pp.1-114.
16. Cowan MM (1999) **Plant products as antimicrobial agents.** *Clinical Microbiological Review* 12(4) 564-582.
17. Denis Gerlier, Nicole Thomasset. (1986). **Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation,** *Journal of Immunological Methods*, 94: 57-63.
18. Duarte S KooH Bowen WH Haycibara MF Cury JA Ikegaky M Park YK Rosalen DL (2003). **Effect of a novel type of propolis and it's a chemical fractions glucosyltransferasesand on groth and adherence of mutans streptococcus.** *Biological Pharmaceutical Bulletin*; 26: 527-531.
19. Eberhart R.J., Harmon V.M.P. (1987). **Conceptos actuales de mastitis bovina, consejo nacional de mastitis.** Copyright 1987, Nacional Mastitis Council, derechos reservados, Pag 6,7
20. **Efecto del extracto de Calendula officinalis (mercadela) y Ammhipterygium adstringens (cuachalalate) en cultivos celulares evidenciado por el método colorimétrico de Moosman.** 2006. Primer Congreso Iberoamericano de Fitoterapia, Volumen 6, Suplemento Sociedad Española de Fitoterapia. Pag 109.
21. Elmer W. Koneman, M.D. Stephe d. Allen. (1999). **Diagnóstico microbiológico texto y atlas a color.** Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires-Bogota-Caracas, 1999. pag 672, 800
22. Enzo A., Tosi, Edmundo Re., Marta E. O., Ampelio F. C. (2007). **Food preservative based on propolis: Bacteriostatic activity of propolis polyphenols and flavonoids upon Escherichia coli.** *Food Chemistry* 104 1025-1029.

23. Gieseck H.W. (1975). **The definition of bovine mastitis and the diagnosis of its subclinical types during normal lactation.** Proceedings of the IDF seminar on mastitis control. Reading University. Collage of Estate Management, Reading England.
24. Gómez O.R.S, López BB., González L.G., Ruiz S.H., **“México 50 años de la importancia de leche en polvo” 1940-1990” XVII Congreso.**
25. Gonzalez G.S., Ma. Rosario R.V., Eliseo Manuel H.B. (2009). **Microscopia electrónica**, 1ª edición, Ciudad Universitaria, México DF. Pag. 25.
26. Han SK, Park H.K. (1995) **A study on the preservation of meat products by natural propolis: effect of EEP protein change of meat products.** Korean Journal of Animal science; 37:551-557
27. Hausteen, B., (2002). **The Biochemistry and medical Significance of the flavonoids.** Pharmacology and therapeutic, 96: 67-202
28. Hegazi AG., Abd E., Hady FK., Allah FA. 2000 **Chemical composition and antimicrobial activity of European propolis.** Z Naturforsch vol 55:70-75
29. Hernández N.M.R. Bernal, K.C. (1990). **Efecto antibiótico del propoleo frente a cepas de *Staphylococcus aureus* origen clínico humano.** Revista Cubana de Farmacología; 24: 45-50.
30. Ivanovska ND, Dimov VB, Bankova VS, Popov SS. (1995). **Immunodulatory action of propolis. IV. Influence of water soluble derivative on complement activity in vivo.** J. Ethnopharmacology; 47: 145-147.
31. Jacques Nicolet. (1985). **Compendio de bacteriología medica veterinaria**, Editorial Acribia, S.A, Zaragoza-España, pag 176,197,198,493,
32. Jawetz, Melnick, Adelberg, **microbiología médica**, 18ª edición, Editorial El manual Moderno, Colombia.
33. Kaizer O, Kolodziej H (1997) **Antibacterial activity of extracts and constituents of *Pelargonium sidoides* and *Pelargonium reniforme*.** Planta medical; 63(6): 508-510.
34. Kedzia B, Geppert, B. Iwaszkiewicz, J., (1990). **Pharmacological investigations of ethanolic extrac of propolis** Phytotherapie, 6:7-10.
35. Kiol, W., Scheller; S; Shani, J. Pietsz., G., Czuba Z. (1993). **Synergistic effect of ethanol extract of propolis. And**

- antibiotics in the growth of *Staphylococcus aureus*.** Drugs research; 43: 607-608
36. Larroa, T.R.M. **Hacia una tipología de leche en México.** Seminario internacional aproximación
37. Larrondo, M.E. **La autosuficiencia lechera en México.** Seminario Internacional. UAM-X 1995.
38. Li-Chang Lu. Yue-Wen Chen. Cheng-Chun Chou. (2005). **Antibacterial activity of propolis against *Staphylococcus aureus*.** International Journal of food Microbiology 102: 213-220.
39. Martínez U.C., 2008. **Efecto del Extracto Etanólico de Propoleo sobre el crecimiento y el daños estructural de *Candida albicans*.** Pag 53-63
40. Matsuda, S. (1999). **Propolis Health care food. Foods Food Ingredients.** J. Jap., 160: 64-73
41. Merchant J.A., Packer R.A. **Bacteriología y virología veterinarias**, 3ª edición española, 2ª reimpresión, Editorial Acribia, Zaragoza-España. Pag 491
42. Metzner J, Bekemeier H, Paintz M, Schedewind E. (1979). **On the antimicrobial activity of propolis and propolis contstituenis.** Pharmacia: Vol 34:97-102.
43. Michael T. Madigan, Martinko J.M., Jack Parker. (2004). **Biología de los microorganismos**, 10ª edición, Editorial Pearson Educación S.A. pagina 78.
44. Mirzoeva Ok., Grishanin RN., Calder PC. (1997). **Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria.** Microbiology Research; 152(3): 239-246 Plan medic 1994 June; 60 (3): 222-227
45. Morales Sánchez M.A. (2002). Efecto de *Caléndula officinalis* en *Pseudomonas aeruginosa* evidenciado por Microscopia Electrónica de Transmisión. Pagina 42-45
46. Murad JM., Calvi SA., Soares A.M.V.C., Bankova V, Sforcin J.M. (2002). **Effects of propolis from Brazilian and Bulgaria on fungicidal activity of macrophages against *Paracocadioides brasiliensis*.** J. Ethnopharmacology,; 79: 331-334
47. Noa A., Perez A., Gutierrez R.,Escobar A. (2001). **Los residuos químicos en la leche: importancia y problemática actual en México y el mundo.** Pág.68-69, 94, 105

48. Paulino N., Teixeira C, Martins, R, Scremin. A, Dirsdh VM, Volmar AM. (2006). **Evaluation of the analgesic and antiinflammatory effects of a Brazilian green propolis.** *Planta medicinal*; 72: 899-906.
49. Quinn P.J., Markey B.J., **Elementos de microbiología veterinaria**, editorial Acribia S.A., Zaragoza España, 2003.
50. Quintero M.L, Londoño O.A., Hernandez H.F., Hernandez H.F., López M.R., Soto C.I., Carrillo M.L., Penieres C.G., García C.G., Cruz Sanchez T.A. 2008. **Effect of Mexican propolis extracts from *Apis mellifera* on *Candida albicans* in vitro growth.** *Revista Iberoamericana Micology*: 25 (1)
51. Recio MC Rios, LL Villar A (1989) **A review of some antimicrobial compounds isolated from medicinal plants reported in the literature 1978-1988.** *Phytotherapy Research*, 3(4), 117-125.
52. Sandra Isabel Bernal Ayala. (2000). **Evaluación de algunos productos derivados del ácido carbámico como agentes antimicrobianos.** Pag 18.
53. Santos V. P., Amenta J, Aguiar MC, Naves MD., Mesquita R.A. (2005). **Oral candidiasis treatment with Brazilian ethanol propolis extract.** *Phitother Research*; 19: 652-654.
54. Sauri, G.: **Caída del 13.1 %la producción de leche 1995.** Análisis económico el Financiero. Año XV
55. Scanlan CH.M., **Introducción a la bacteriología diagnóstica veterinaria**, Editorial Acribia, S.A., Zaragoza-España, 1991. pag 139, 197-198.
56. Schalm O.W., Carroll J.E., N.C. **bovine mastitis.** Philadelphia: Lea and Febiger, 1971.
57. Scazzocchio F., D' Auria FD., Alessandrini D., Pantanella F. 2006. **Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis.** *Microbiology Research*; 101: 327-333.
58. Sforcin, JM., Fernandes Jr. A., Lopez. C.A.M., Bankova, V., Funari, S.R.C., 2000 **Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity.** *J. Ethnopharmacology*,; 73: 243-249
59. **Situación actual de la leche en México, 1995-2004**
60. Takasai-Kikuni NB., Schilcher. (1994). **Electron microscopic and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance.**
61. Takaisi-Kikuni N.B., Schilcher H. (1994). **Electron microscopic and misrocalorimetric investigations of the posible**



- 
- mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance**, *Planta Medicinal*; 60(3): 222-227.
62. Vonder R., W. Adam W., Gangel H. **enfermedades del ganado bovino**, Editorial Acribia, Zaragoza-España.
  63. Wayne W. Daniel, **Bioestadística: base para el analisis de las ciencias de la salud**, Limusa Wiley, 4ª edición en España. Pag 241-246.
  64. Warren Levison **Microbiología e Inmunología medicas**, Mac Graw-Hill Interamericana 8ª edición, Madrid-Buenos Aires, 2006. pag 167
  65. Wiesner E., William C., Rebhun, Guard Chuck, **Enfermedades del ganado vacuno**. Editorial ACRIBIA, S.A, Zaragoza- España, 1991, Pág. 332-344, 345-346.
  66. William C., Rebhun, Guard Chuck., **Enfermedades del ganado vacuno**, Editorial Acribia S.A., Zaragoza-España, 1999. pag 362-389
  67. Zinsser. **microbiología**, 20ª edición, Editorial Médica-Panamericana, Buenos Aires-Bogotá-Caracas-Madrid. Pag 254,730
  68. Moosman, T. Rapad colorimetric assay for cellular growth and survival; aplication proliferation and citotoxicity assays. *J. Inumology. Methods* 1983. 65,55
  69. Ralph J. Fessenden. **Química Orgánica**., University of Montana. Pag 30\*