



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTILÁN**

**“Efecto inhibitorio del extracto de Propóleo en
bacterias aisladas de casos de mastitis bovina”.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACEÚTICA BIOLÓGA

P R E S E N T A:

RAMÍREZ GONZÁLEZ AMALIA ARIZBÉ

**ASESORES: M.V.Z GERARDO CRUZ JÍMENEZ
M.V.Z. JOSE ANTONIO LICEA VEGA**



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.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme cerrar un ciclo mas en mi vida, por demostrarme tantas veces su existencia y con ello darme la capacidad, paciencia y fuerza para levantarme de cada tropiezo y llegar hasta aquí.

A mis mayores tesoros que me dio la vida Rebeca e Isaac ya que han estado conmigo en las buenas y en las malas, por soportar mi genio, por su amor y ternura, aunque no soy la mama perfecta quiero que sepan que los amo y los quiero por sobre todas las cosas, que ustedes son mi motor principal para seguir adelante y esto también es logro suyo.

A mi querido esposo Gamaliel porque gracias a tu esfuerzo, ayuda, comprensión, paciencia y confianza en mí he podido llegar al final de esta meta, que tu sabes ha estado llena de tropiezos y carencias pero a pesar de todo esto juntos lo hemos logrado porque este logro también es tuyo ya que sin tí no lo hubiera podido lograr.

A mis padres Hilda y Alejandro porque me siento muy orgullosa de tener unos padres como ustedes, gracias por darme la vida, por todo su apoyo desinteresado, por su comprensión y paciencia y porque son una parte muy importante en mi vida. Muchas gracias porque me hicieron la persona que ahora soy y de la cual espero estén siempre orgullosos.

A mis hermanos Angel y Obed, porque hemos compartido momentos buenos y malos, por su apoyo y sobre todo por su amor.

A mis sobrinos Emanuel, Carlos y Cintia por el cariño que me han demostrado, a tí Silvia porque eres una hermana para mí, muchas gracias por todo tu apoyo incondicional y por tu cariño que me has demostrado a lo largo de todos estos años.

A mis tíos Elba y Rolando muchas gracias por todo el apoyo y cariño que me han dado todos estos años, los quiero y los admiro por ser unas personas tan maravillosas.

A mis asesor de tesis MVZ Gerardo Cruz muchas gracias por sus enseñanzas, por la confianza depositada en mí, por su humildad, por todo el tiempo y esfuerzo que ha puesto en ayudarme a realizar este trabajo. Lo quiero y lo respeto por ser una persona maravillosa y porque además de todo es un gran amigo.

A mi asesor de tesis MVZ José Antonio Licea por permitirme trabajar con usted, por el tiempo invertido en la realización de este trabajo, por sus enseñanzas y la confianza que tuvo en mí muchas gracias.

A la UNAM la mejor universidad, por haberme dado la oportunidad de pertenecer a esta casa de estudios y porque me siento muy orgullosa de ser universitaria de corazón.

A mis sinodales por su tiempo, sus valiosos comentarios y sugerencias para la revisión y mejoramiento de este trabajo.

A mis amigos de generación la mejor 25, que han sido una parte muy importante en mi vida, por todos los buenos y malos momentos que compartimos, a mi querido Fernando porque siempre has estado conmigo, porque me enseñaste que el que quiere puede a pesar de todos los obstáculos sabes que te quiero y tienes un lugar especial, a ti Jorge por todo tu apoyo, ayuda y amistad desinteresada, porque estuviste conmigo en momentos difíciles, porque se que siempre cuento contigo aunque estés lejos y como te lo he dicho te quiero mucho, a ti David que me demostraste que no importa el tiempo cuando en realidad se quieren las cosas, a ti Omar por ser una persona decidida, por ese carácter que tienes para lograr lo que te propones y que en verdad me ha dado una buena lección, Susana porque me has apoyado en momentos que tu sabes han sido muy difíciles y has estado ahí para escucharme y de verdad te digo que lo valoro así que sábelo te quiero mucho y a ti Carlos también te quiero por ser un gran amigo y mejor persona, Caro y Daniel por permitirme ser su amiga y de verdad se los digo ustedes fueron un gran apoyo cuando mas lo necesite, porque con sus palabras hicieron que siguiera adelante, muchas gracias los quiero, a ti Laura porque eres una gran mujer y mejor madre, gracias por ser mi amiga durante todo este tiempo, y como la lista podría seguir les doy las gracias a todos mis amigos Raul, Kena, Araceli, Luis, Alvaro, Rocío, Mireya, Laura Garrido, Jesica, Itshel, Alma, Maria Luisa , Renata, Jesica, Xochilt, Tere, Marlen, Dulce, Gustavo, Lenin, Carlos y Eleazar.

A mis amigas que han jugado un papel muy importante en este tiempo, porque gracias a su insistencia y apoyo me decidí a terminar este proyecto gracias Tania, Susana, Ivon, Esmeralda y Vanía.

A todos aquellos profesores que de una u otra forma me enseñaron a ser una mejor persona y gracias a sus enseñanzas hoy puedo concluir este trabajo en especial Profesora María Esther, Leticia Zúñiga, María Elena Mondragón, Lidia Rangel, María Luisa, Patricia Campos, Lourdes Galván, Mari Tere Domínguez, Víctor Cendejas, Sonia Rincón, Patricia Zúñiga, René Miranda, Rodolfo Cruz, Juan José, Enrique Angeles, Virginia Benítez, profesora Rebolgar, Ganem y todos aquellos que contribuyeron en mi formación.

A las FES-Cuautitlán por ser mi casa durante mucho tiempo, por darme todas esas experiencias a lo largo de mi carrera.

ÍNDICE GENERAL.

| | |
|--|-----|
| Índice general..... | I |
| Índice de tablas..... | II |
| Índice de gráficos..... | III |
| Índice de imágenes..... | III |
| Índice de abreviaturas..... | IV |
| Resumen..... | V |
| Introducción..... | 1 |
| 1.1. Mastitis bovina..... | 1 |
| 1.2. Factores predisponentes..... | 2 |
| 1.3. Etiología..... | 3 |
| 1.3.1. Factores traumáticos..... | 3 |
| 1.3.2. Factores mecánicos..... | 3 |
| 1.3.3. Factores biológicos..... | 4 |
| 1.4. Clasificación..... | 5 |
| 1.4.1. Mastitis subclínica..... | 5 |
| 1.4.2. Mastitis clínica..... | 5 |
| 1.5. Diagnóstico..... | 6 |
| 1.5.1. Prueba de California..... | 7 |
| 1.5.2. Prueba de Wisconsin..... | 8 |
| 1.5.3. Prueba de Whiteside..... | 8 |
| 1.6. Tratamiento..... | 8 |
| 1.7. Propóleo..... | 10 |
| 1.7.1. Antecedentes..... | 10 |
| 1.7.2. Origen..... | 10 |
| 1.7.3. Composición..... | 11 |
| 1.7.4. Propiedades..... | 12 |
| 1.7.5. Mecanismo de acción..... | 12 |
| 1.7.6. Indicaciones terapéuticas del propóleo..... | 13 |
| 2.0. Objetivos..... | 14 |

| | |
|---|----|
| 3.0. Hipótesis..... | 14 |
| 4.0. Metodología..... | 15 |
| 4.1. Obtención del propóleo crudo..... | 15 |
| 4.2. Obtención del extracto de propóleo..... | 15 |
| 4.3. Obtención del extracto de propóleo liofilizado..... | 15 |
| 4.4. Identificación de cepas..... | 15 |
| 4.5. Activación de cepas..... | 17 |
| 4.6. Enfrentamiento bacteriano con el extracto de propóleo..... | 17 |
| 4.7. Diagrama de trabajo..... | 19 |
| 5.0. Resultados..... | 20 |
| 6.0. Discusión..... | 31 |
| 7.0. Conclusiones..... | 33 |
| 8.0. Apéndice..... | 34 |
| 9.0. Bibliografía..... | 35 |

ÍNDICE DE TABLAS.

| | |
|--|----|
| 1. Agentes infecciosos causantes de mastitis..... | 4 |
| 2. Identificación del Genero Streptococcus..... | 15 |
| 3. Identificación del Género Staphylococcus..... | 16 |
| 4. Identificación de bacterias Gram negativas..... | 16 |
| 5. Esquema de trabajo en placa de cultivo celular..... | 18 |
| 6. Porcentaje de crecimiento del <i>Staphylococcus aureus</i> | 20 |
| 7. Porcentaje crecimiento del <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 21 |
| 8. Porcentaje de crecimiento del <i>Streptococcus agalactiae</i> * cepa 1..... | 22 |
| 9. Porcentaje de crecimiento del <i>Streptococcus agalactiae</i> *cepa 2..... | 23 |
| 10. Porcentaje de crecimiento del Streptococcus Gpo C *cepa 1..... | 24 |
| 11. Porcentaje de crecimiento del <i>Streptococcus</i> Gpo C *cepa 2..... | 25 |
| 12. Porcentaje de crecimiento del Streptococcus Grupo c * cepa 3..... | 26 |
| 13. Porcentaje de crecimiento del <i>Streptococcus</i> Gpo D enterococo..... | 27 |

| | |
|--|----|
| 11. Porcentaje de crecimiento del <i>Pseudomona putida</i> | 28 |
| 12. Porcentaje de crecimiento del <i>Escherichia coli</i> | 29 |
| 13. Concentración Mínima Inhibitoria de propóleo para cada bacteria..... | 30 |

ÍNDICE DE GRAFICOS.

| | |
|---|----|
| 1. Crecimiento bacteriano del <i>Staphylococcus aureus</i> | 19 |
| 2. Crecimiento bacteriano del <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 20 |
| 3. Crecimiento bacteriano del <i>Streptococcus agalactiae</i> cepa 1..... | 21 |
| 4. Crecimiento bacteriano de <i>Streptococcus agalactiae</i> cepa 2..... | 22 |
| 5. Crecimiento bacteriano de <i>Streptococcus</i> del Grupo C cepa 1..... | 23 |
| 6. Crecimiento bacteriano de <i>Streptococcus</i> del Grupo C cepa 2..... | 24 |
| 7. Crecimiento bacteriano de <i>Streptococcus</i> del Grupo C cepa 3..... | 25 |
| 8. Crecimiento bacteriano de <i>Streptococcus</i> del Grupo D enterococo..... | 26 |
| 9. Crecimiento bacteriano de <i>Pseudomonas putida</i> | 27 |
| 10. Crecimiento bacteriano de <i>Escherichia coli</i> | 28 |

ÍNDICE DE IMÁGENES.

| | |
|---|----|
| 1. Ubre con mastitis..... | 1 |
| 2. Ubre inflamada..... | 6 |
| 3. Prueba de California..... | 7 |
| 4. Terapia intramamaria..... | 9 |
| 5. Recolecta de polen..... | 10 |
| 6. <i>Apis mellifera</i> , secretando propóleo..... | 10 |
| 7. Propóleo extracto crudo..... | 10 |
| 8. Compuestos fenólicos de acción farmacológica en el propóleo..... | 11 |

| | |
|--|----|
| 9. Pruebas para la identificación de <i>Streptococcus agalactiae</i> | 16 |
| 10. Pruebas para la identificación de <i>Streptococcus pyogenes</i> | 16 |
| 11. Pruebas para la identificación de <i>Staphylococcus aureus</i> | 16 |
| 12. Pruebas para la identificación de <i>Escherichia Coli</i> | 17 |

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

| | |
|------|---|
| MIC | Concentración mínima inhibitoria |
| EP | Extracto de propóleo |
| MBC | Concentración mínima bactericida |
| BHI | Infusión cerebro corazón |
| MTT | 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5 difeniltetrazol (Sal de Tetrazolium). |
| SSFE | Solución salina fisiológica |
| UFC | Unidad formadora de colonias |
| mg | Miligramos |
| µg | Microgramos |
| ml | Mililitros |
| µl | Microlitros |

RESUMEN

La mastitis es una inflamación, que irrita la ubre e interfiere en el flujo normal y la calidad de la leche. Se observan anomalías en la ubre y/o secreción, la mastitis clínica puede variar notablemente en severidad dependiendo en parte al tipo de microorganismo invasor. (Eberhart, 1987). El objetivo de este trabajo fue: Determinar *in vitro* el efecto inhibitorio del extracto de Propóleo en bacterias aisladas de casos de mastitis bovina utilizando la técnica de MTT. Metodología, el propóleo fue obtenido de los apiarios de la FES Cuautitlán C-4 y se le hizo una extracción hidroalcohólica (50/50), se esterilizó por filtración (empezando con 3, 0.8, 0.22 μm), se hizo prueba de esterilidad y se liofilizó para eliminar el etanol. La concentración de propóleo como solución de trabajo fue de 50 mg/ml. Se usaron 10 cepas bacterianas aisladas de casos de mastitis bovina en la Cuenca Lechera de Tizayuca Hidalgo. Las cepas se estandarizaron al 0.5 del nefelómetro de McFarland (1×10^8 UFC/ml) en tubos con 10 ml de caldo BHI estéril a doble concentración. Se trabajó por duplicado en placas de 96 pozos, enumerando las columnas de 1 a 12. En la columna 1 se colocaron 100 μl de extracto de propóleo con una concentración de 50 mg/ml y 100 μl de bacterias estandarizadas al 0.5 de McFarland en BHI a doble concentración, para dar un total de 200 μl por pozo y el BHI quede finalmente a concentración normal. A partir de la columna 2 a la columna 9 se colocaron 100 μl de BHI caldo a doble concentración y se agregaron 100 μl de extracto de propóleo (50 mg/ml). De la columna 2 se pipeteó y se transfirieron 100 μl a la columna 3, quedando la columna 2 con 100 μl y 25 mg/ml y así sucesivamente hasta la columna 9. Se tiene entonces un rango de concentración de propóleo de 50 – 0.195 mg/ml. Se añadió 100 μl de bacterias en toda la placa exceptuando las columnas 10 y 12. A la columna 10 se añadió 100 μl de BHI doble concentración y 100 μl de extracto de propóleo (50 mg/ml), esta columna es el Blanco. La columna 11 se utilizó como control positivo adicionando 100 μl de BHI doble concentración y 100 μl con Bacteria estandarizada. A la columna 12 se adicionó solo caldo BHI 200 μl , este es el Control negativo.

Se incubo la placa por 24 horas a una temperatura de 37°C, para adicionarle 10 µl del reactivo de MTT a una concentración de 5 mg/ml. Se incubo por 3 horas a 37°C. El alcohol isopropílico se emplea como reactivo de paro añadiéndose 40 µl. Las lecturas se obtuvieron en un lector por medio de absorbancias a una longitud de onda de 570 nm. Resultados: el 100% de las bacterias trabajadas mostraron inhibición al extracto de propóleo a diferentes concentraciones, se realizo un estudio estadístico con lo cual se determino la MIC para cada una de ellas, *Staphylococcus aureus* tuvo una MIC de 6.25 mg/ml, *Staphylococcus epidermidis* 3.12 mg/ml, *Streptococcus agalactiae cepa 1*, 50 mg/ml, *Streptococcus agalactiae cepa 2*, 3.12 mg/ml, *Streptococcus del Gpo C cepa 1*, 6.25 mg/ml, *Streptococcus del Gpo C cepa 2*, 50 mg/ml, *Streptococcus del Gpo C cepa 3*, 1.56 mg/ml, *Streptococcus del Gpo D enterococo* 6.12 mg/ml, *Pseudomonas putida* 12.5 mg/ml y *Escherichia coli* 12.05 mg/ml. Se demostró el efecto inhibitorio del propóleo sobre todas las bacterias aisladas de casos de mastitis bovina por medio de la técnica de Mosmann. Nosotros proponemos, que se debe seguir investigando la actividad del propóleo en bacterias causantes de mastitis usando un tamaño de muestra más amplio para así obtener resultados significativos y poder proponerlo como un tratamiento alternativo.

INTRODUCCIÓN

1.1. Mastitis bovina.

La mastitis es uno de los principales problemas en la producción y calidad de la leche. La mastitis se define como la inflamación de la glándula mamaria, que generalmente se presenta como una respuesta a la invasión por microorganismos y se caracteriza por daños en el epitelio glandular, seguido por una inflamación que puede presentarse con cambios patológicos localizados o generalizados, dependiendo de la magnitud del daño. (Kerr y Wellnitz, 2003; Bannerman *et al.*, 2004; Hansen *et al.*, 2004; Hillerton y Berry, 2005). (Imagen 1)

El desarrollo de la mastitis es un proceso dinámico que incluye al ambiente, el manejo de los animales, susceptibilidad a la enfermedad y a la eficiencia de sus mecanismos de defensa y a los microorganismos que penetran a través del canal del pezón. (Saron Arthur, Marcelo Chaffer, 2000).

El problema de la mastitis ocupa el segundo lugar entre las causas de desecho involuntario. Económicamente, ésta se relaciona directamente con los gastos ocasionados por pérdidas de animales, reducción en la producción de la leche en porcentajes variando del 20 al 80 %. (Bedolla C.C. *et al.* 2008). El costo de los medicamentos para su tratamiento, la pérdida de leche eliminada o decomisada por el uso de antibióticos, el acortamiento de la vida productiva de los animales retirados, así como las alteraciones en la calidad de la leche hacen aumentar los costos totales de la producción. Estas pérdidas se pueden reducir substancialmente, siguiendo prácticas sanas de manejo. (Sauri G., 1996)

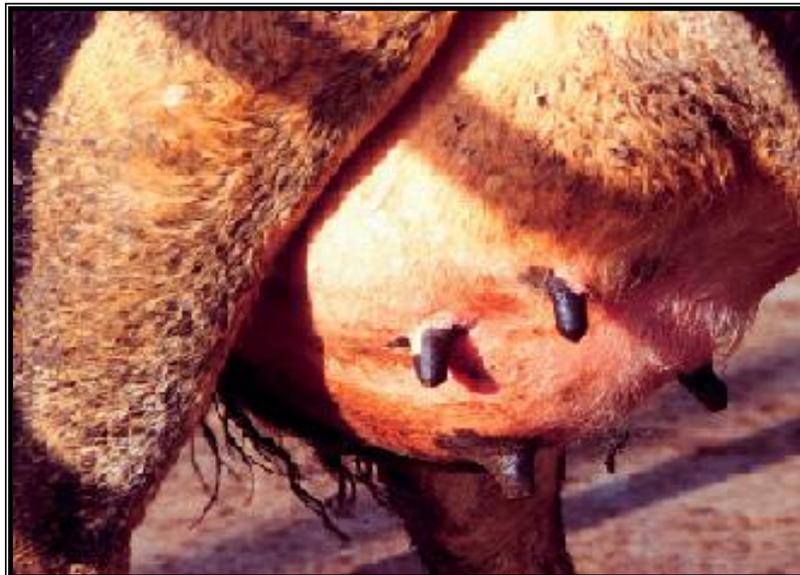


Imagen 1 Ubre con mastitis

1.2. Factores predisponentes.

Las condiciones que favorecen la presentación de esta enfermedad directa o indirectamente son:

Edad: vacas de más de cinco partos suelen presentar mastitis subclínica en uno o varios cuartos.

Alojamiento y medio ambiente: se aconseja una temperatura ideal de 15°C con una humedad del 70 %.

Procedimiento de ordeño: lavado, desinfección y colocación de pezoneras.

Ordeño y material de empleo: de estos factores deben diferenciarse dos condiciones inherentes al ordeñador, la colocación de las pezoneras, desinfección de las mismas, el tiempo de ordeño y el mantenimiento correcto de las superficies que tienen contacto con las gomas de las pezoneras. (Radostits O.M., Gay C.C., 2002).

Alimentación: una alimentación rica en proteína predispone a mastitis, al igual la deficiencia de minerales. Otros autores afirman que las dietas bajas en proteínas predisponen a un proceso morbozo, dado que el animal no puede crear anticuerpos y se vuelve susceptible a algunas enfermedades. (Eberhart R. J., Harmon V.M., 1987).

La aparición de la mastitis es compleja, se explica de manera sencilla en tres fases:

Invasión:

Fase en la cual penetran los microorganismos del exterior del pezón a la leche que se encuentra en el canal del mismo. Esta fase se ve favorecida cuando el esfínter del pezón se encuentra lesionado. Prácticamente todos los casos provienen de la entrada y multiplicación de microorganismos en la glándula mamaria. Los principales vectores de los organismos son factores ambientales, suelo, cama, equipo de ordeño, toallas, manos de ordeñadores y el agua para lavar. (Saron Arthur, Marcelo Chaffer, 2000).

Infección:

Esta fase se caracteriza por que las bacterias se multiplican rápidamente invadiendo el tejido glandular, una vez que éstas se encuentran en un ambiente propicio para su desarrollo y multiplicación, se valen de sus toxinas para invadir tejidos adyacentes.

Inflamación:

La presencia de bacterias y/o toxinas en el tejido glandular, crea un efecto quimiotáctico sobre las células de defensa del huésped, aumentando la afluencia de leucocitos, macrófagos y demás elementos que participan en la inflamación. Este fenómeno se aprecia por la tumefacción, enrojecimiento y aumento de la temperatura local, a esto es lo que se conoce propiamente como mastitis. (E. Wiesner, *et al.* 1991)

1.3. Etiología.

La mastitis constituye un tipo de reacción inflamatoria de la glándula mamaria que puede ser ocasionado por factores tanto físicos, mecánicos o infecciosos frecuentes e importantes requiriendo de mayor atención.

1.3.1. Factores traumáticos.

Se conoce así a las distintas causas que por acción de un traumatismo de cualquier índole altera la anatomía de la glándula mamaria y particularmente del pezón.

Tomando en cuenta que el esfínter del canal del pezón es la barrera natural para la entrada de microorganismos, adquiere gran importancia la conservación estructural y funcional del mismo; porque en condiciones fisiológicas normales, el esfínter tarda hasta dos horas en volver al diámetro original al ordeño, tiempo suficiente para que pueda producirse la penetración de gérmenes al interior del pezón.

De igual modo los factores que provocan lesiones o trastornos funcionales en el canal del pezón facilitan aún más la penetración de agentes patógenos.

Las lesiones en el pezón al producir dolor, determinan un ordeño difícil así como la correspondiente retención de leche; los ruidos y cambios ambientales influyen en los mecanismos neuro-endocrinos que determinan la eyección de la leche y tienen el mismo efecto negativo. (Saron Arthur, Marcelo Chaffer, 2000).

1.3.2. Factores mecánicos:

Se refieren principalmente a aquellas diferencias en la práctica de la ordeña, ya sea mecánica o manual.

El exceso de vacío en la máquina de ordeño favorece el pasaje de gérmenes al canal del pezón, y trastornos neuro-circulatorios con isquemia o hiperemia pasiva, llegando en casos graves a producir prolapso del canal.

Altas frecuencias de pulsación o sobreordeño, presentan efectos similares a los anteriores. Períodos entre ordeños excesivamente largos ocasionan la apertura del canal por la presión que ejerce la leche sobre el extremo proximal del mismo. (Wolter W, *et al.* 2000)

1.3.3. Factores biológicos:

Para poder controlar la mastitis bovina se deben de conocer cuales son los microorganismos causantes de esta, se dan en casos esporádicos que los bacterianos, siendo éstas las principales responsables de la etiología.

El microorganismo para poder ocasionar una infección necesita de varios factores, en primer lugar es necesario que se ponga en contacto el agente patógeno y el hospedero, y dependiendo de las condiciones de uno y de otro determinará la evolución de la enfermedad. Hay diversos agentes que causan la mastitis, pero solo algunos de ellos pueden desarrollarse adecuadamente en la leche e infectar el tejido glandular.

Las sustancias lipídicas y la masa sebácea del canal estriado actúan como bactericidas sellando el pezón impidiendo así la penetración de las bacterias. Por lo que el canal estriado es la primera barrera contra la infección. Algunas bacterias cruzan el canal por las fuerzas físicas generadas por la ordeñadora.

Los agentes infecciosos causantes de mastitis según el “National Mastitis Council” (Eberhart R. J., Harmon V.M., 1987) se describen en la tabla No 1.

| | | |
|----------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|
| BACTERIAS Gram + | <i>Streptococcus agalactiae</i> | <i>Staphylococcus aureus</i> |
| | <i>Streptococcus dysgalactiae</i> | <i>Staphylococcus epidermidis</i> |
| | <i>Streptococcus uberis</i> | <i>Actinomyces pyogenes</i> |
| | <i>Streptococcus zooepidemicus</i> | <i>Corynebacterium bovis</i> |
| | <i>Streptococcus pyogenes</i> | |
| BACTERIAS Gram - | <i>Escherichia coli</i> | <i>Pasteurella multocida</i> |
| | <i>Enterobacter aerogenes</i> | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> |
| | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | <i>Serratia marcescens</i> |
| | <i>Proteus sp.</i> | |
| OTRAS BACTERIAS | <i>Mycoplasma bovis</i> | |
| | <i>Mycoplasma bovigenitalium</i> | |
| | <i>Mycoplasma alkalescens</i> | |
| | <i>Mycoplasma canadensis</i> | |
| | <i>Nocardia asteroides</i> | |
| | <i>Mycobacterium sp.</i> | |
| | <i>Pichia farinosa</i> | |
| | <i>Brucella abortus</i> | |
| <i>Brucella melitensis</i> | | |
| HONGOS Y LEVADURAS | <i>Candida albicans</i> | |
| | <i>Trichosporum sp</i> | |
| | <i>Cryptococcus neoformans</i> | |
| | <i>Sacharomyces sp</i> | |
| | <i>Torulopsis sp.</i> | |

1.4. Clasificación.

La clasificación de la mastitis depende básicamente del tiempo de evolución que tiene la enfermedad, así una mastitis que se inicia en forma brusca afectando uno o varios cuartos se clasificará como aguda. El grado de afección como en todas las infecciones depende de dos aspectos, la resistencia del hospedero y el grado de virulencia del agente patógeno. (Eberhart, R.J., Harmon V.M.P.,1987)

Dado que la mastitis es un estado patológico que afecta a la vaca en cuanto se encuentra en estado productivo, las manifestaciones patológicas no sólo se observarán en el tejido mamario sino también en la leche. En general la mastitis se clasifica en:

1.4.1. Mastitis subclínica.

Se caracteriza por estar aparentemente bien la glándula mamaria, la leche y la vaca, la glándula mamaria a la inspección y a la palpación aparentemente se encuentra sin cambios en el parénquima glandular, la leche extraída aparentemente no tiene cambios en cuanto a su color, sabor, consistencia, etc. Y la vaca no presenta signos de infección como fiebre, anorexia, atonía, taquicardia, polipnea, etc., es la que más pérdidas produce. Se requerirá para su diagnóstico pruebas a base de reactivos como es el de california. Si el proceso de inflamación e infección no lo paramos aquí se transforma en mastitis clínica. (Cerero Omelio, *et al.* 2005, Pérez *et al.*, 2005).

1.4.2. Mastitis Clínica.

Se caracteriza por generar alteraciones que se pueden detectar, como cambios en el color de la leche, pudiéndose presentar amarillenta, rojiza, etc., cambios en su sabor, cambios en la consistencia presentándose cremosa, espesa, etc. Acompañada de coágulos y/o tolondrones y/o natillas, a la palpación podemos detectar cambios en el parénquima glandular detectándose caliente, firme, dura, etc., y los animales pueden presentar fiebre, taquicardia, polipnea, anorexia, atonía, etc. representado perdidas para el productor.

La mastitis clínica se puede dividir en:

Mastitis Moderadamente Aguda (MMA): La infección es detectada pasadas las 24 horas, la vaca tiene sus constantes fisiológicas normales, a la inspección la ubre se ve normal, a la palpación el parénquima es normal, pero la leche sale acompañada con un poco de natillas o tolondrones que pueden ser detectadas al realizar la prueba de tazón oscuro obligatoria antes de ordeñar a cada vaca.

Mastitis Severamente Aguda: Con evolución de 72 horas. Las constantes fisiológicas están normales. La leche sale con más cantidad de tolondrones, a la inspección ya se aprecia cierta inflamación en la glándula, en relación con las otras tres y a la palpación la glándula esta dura y caliente, se pierde el 40 % de producción.

Mastitis Crónica (MC): La infección tiene más de 5 días, toda la leche sale con tolondrones, la ubre está severamente inflamada, endurecida y caliente, la vaca tiene fiebre, taquicardia, polipnea, atonía ruminal, anorexia, etc. , se pierde el 50 % de producción. (Imagen 2)

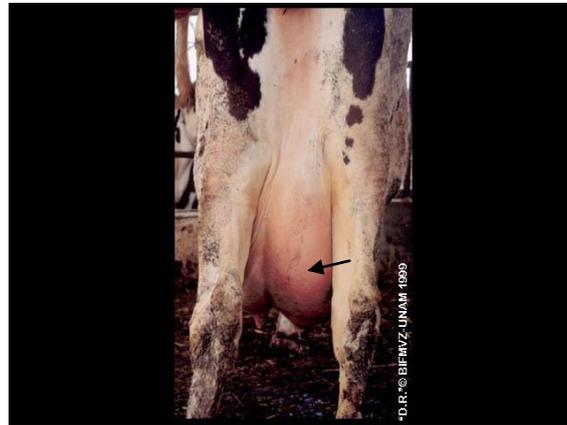


Imagen 2. Ubre inflamada

Mastitis con glándula improductiva o glándula ciega (MI): la infección ya tiene en ocasiones semanas, la glándula se ve pequeña, flácida y fría, ya no sale leche sino exudados, las constantes fisiológicas están normales ya que la fibrina se encargo de aislar esta glándula y provoca una hipoxia y necrosis del parénquima con abscesos y exudados como el purulento. Con algunos agentes etiológicos inclusive el parénquima se puede desprender.

Pueden existir mastitis sobreagudas como la causada por *Escherichia coli* que por la toxemia puede matar a una vaca en 3 días, si no se da un tratamiento a tiempo. (Radostits O.M, Gay C.C., 2002)

1.5. Diagnóstico.

La importancia de la mastitis tanto por razones de salud humana como salud animal y los costos que este padecimiento representa en la economía del sistema de producción justifican la trascendencia del estudio de los diferentes procedimientos para la pronta y acelerada identificación de la glándula mamaria que sufre de mastitis. El diagnóstico depende en gran medida de la identificación de anomalías clínicas en la leche. (Bedolla, CC, *et al.* 2007)

Las técnicas empleadas se pueden dividir de la siguiente manera:

- ✓ Pruebas físicas: Paño negro, filtro o cedazo. (Pérez *et al.*, 2005).
- ✓ Pruebas químicas: Cuantificación de cloruros, cambio de pH, prueba de Whiteside. (Pérez *et al.*, 2005).
- ✓ Pruebas biológicas: la prueba de California para mastitis, prueba de Catalasa, prueba de Wisconsin, prueba de CAMP y el monitoreo de células somáticas, así como el diagnóstico bacteriológico por los métodos de aislamiento, cultivo, tinción, bioquímica e identificación (Pérez *et al.*, 2005).
- ✓ Por diagnóstico clínico, llevado a cabo por la observación y palpación, cuando el daño está hecho a la ubre es evidente.
- ✓ Por diagnóstico de laboratorio, generalmente consiste en realizar una serie de pruebas para el aislamiento e identificación del agente causal.

1.5.1 Prueba de California para mastitis.

La prueba de California se basa en la reacción de un compuesto químico, se usa un detergente no ionico (alquilauril sulfonato de sodio) que rompe las células (lisador) y deja salir su ADN fuera de la membrana celular, estos filamentos de ADN tienen tendencia a formar unas estructuras tipo gel cuando se unen unos con otros. Cuando una mama está inflamada por una infección, junto con la leche se eliminan cantidad de células, sobre todo neutrófilos, que son las responsables de proteger al órgano de las bacterias. Mientras mayor sea el número de células más grande será esta especie de gelatina y se dará una calificación mayor. Desafortunadamente esta prueba es muy subjetiva y tiene que hacerse al lado de la vaca durante el ordeño. (Imagen 3) (Morresey, 1999; Radostits, 2000; Medina y Montaldo, 2003; Erskine, 2001; Bedolla, 2004b).



Imagen 3. Prueba de California

1.5.2. Prueba de Wisconsin.

Es una prueba presuntiva permite identificar células somáticas en los tanques de leche a granel. En las plantas de lechería y en los departamentos de bromatología se hace esta prueba como procedimiento de rutina para verificar la cantidad de la leche que se recibe. Los recuentos mayores de 1.500.00 células indican un grave problema de mastitis. El reactivo utilizado es el mismo que el de la prueba de California diluido en proporción de 1:1 usando agua destilada. (Fernández, 1997; NMC, 1999; Bedolla, 2004b).

1.5.3. Prueba de Whiteside.

La mezcla de leche con una solución de NaOH al 4 % ocasiona que aquella se gelifique formando grumos que son visibles. Los grumos serán más grandes conforme la leche contenga mayor número de células somáticas para hacer más visible la reacción es conveniente usar una placa de acrílico negro que puede dibujar 4 cuadros de 3 cm * 3 cm, uno por cada cuarto mamario. (Ávila, 1984; Pérez, 1986).

1.6. **Tratamiento.**

Debido a que varios microorganismos son los responsables de provocar mastitis ha sido imposible elaborar un inmunógeno capaz de prevenirla. Se utilizan tratamientos directos sobre el cuarto afectado o la aplicación parenteral del antibiótico de amplio espectro y antiinflamatorios potentes como la dexametasona. Además de ser un procedimiento “a ciegas”, ya que se utiliza un antibiótico que se sabe puede ser útil, pero no se hace aislamiento de la bacteria causante y al menos aún de la determinación de la sensibilidad por medio de la concentración mínima inhibitoria (MIC).

Un tratamiento aceptable se basa, en gran medida, en el manejo adecuado de los fármacos, además se requiere conocer el espectro y la potencia de éstos, la distribución en tejidos, observándose la liposolubilidad, su constante de disolución (pKa), pH y su unión a las proteínas plasmáticas, espectro apropiado, verificación del antimicrobiano ante la posibilidad de afección de otros órganos de importancia.

El tratamiento de este padecimiento ocasiona un incremento en el tiempo destinado de atención a la vaca afectada, esto representa una inversión monetaria. Dependiendo de la severidad del cuadro clínico, agente etiológico involucrado, tiempo de presentación, período de lactación, prácticas de manejo tales como: ordeño, modelo y condición de alojamientos, etc., será el tratamiento. Este puede consistir en ordeños frecuentes, aplicación de agua, administración de medicamentos por la apertura natural del pezón, intramuscular, intravenosa o en formas combinadas. La decisión debe tomarse en vista de salvar la vida a la vaca, quitarle el dolor, resolver favorablemente el cuadro clínico de mastitis y reincorporarla prontamente a la producción. (Saron Arthur et al. 2000).

La vía intramamaria es la más utilizada para la terapia de la mastitis, ya sea en vacas secas con preparados de larga acción o en vacas de lactancia en forma de infusión. (Imagen 4) Para casi todos los fármacos, el uso de estas vías significa concentraciones desiguales y muchas veces no detectables en el tejido mamario donde la infección tiene lugar. A pesar de las concentraciones en la leche pueden ser superiores a los valores de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) del fármaco. Dentro de la relación costo beneficio diversos autores no recomiendan el uso de la vía intramamaria durante la lactancia, además de que existe una mala relación entre la susceptibilidad *in vitro* y la respuesta *in vivo* con las preparaciones correspondientes.

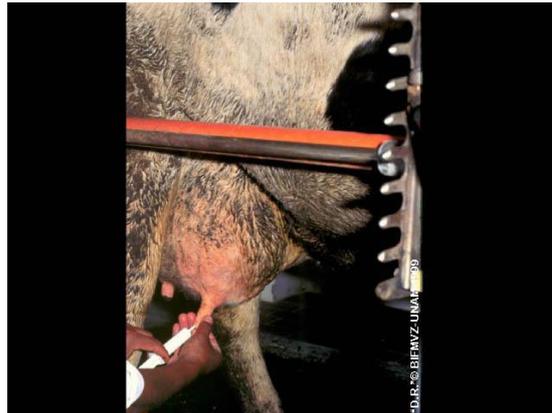


Imagen 4. Terapia intramamaria.

A pesar de esto, la terapia intramamaria es muy efectiva contra *Streptococcus agalactiae* debido a la naturaleza de la infección y debido a las altas concentraciones del antimicrobiano en la leche, fuente necesaria de nutrimento para esta bacteria. En contraste, si la infección es debida a *Staphylococcus aureus*, el rango de éxito será mayor si se administra por vía intramamaria y parenteral (intramuscular o intravenosa) el o los antimicrobianos.

El problema de residuos de medicamentos en la leche está asociado en el tratamiento de la mastitis y otras enfermedades en el ganado. Las propiedades alergénicas de ciertos medicamentos hace que su presencia en la leche sea peligrosa para los consumidores, otro aspecto es el efecto inhibitorio que tienen los residuos de medicamentos en los procesos de fermentación y maduración, causando pérdidas económicas a la industria de los derivados lácteos cada año.

Además los microorganismos pueden presentar resistencia a los fármacos (particularmente beta-lactámicos) ya que sobreviven intracelularmente en los fagocitos en donde los antimicrobianos llegan en cantidades reducidas.

Estas razones justifican la necesidad de utilizar alternativas en el tratamiento de la mastitis, las cuales deben igualar o superar el tratamiento de rutina. Una alternativa viable es la utilización del extracto de propóleo, al ser un producto natural no ha reportado reacciones adversas en su utilización. Estudios científicos atribuyen al propóleo propiedades semejantes a la eritromicina, penicilina y tetraciclinas entre otros. (Scazzocchio F, et al. 2006)

1.7 PROPOLEO.

1.7.1 ANTECEDENTES

Aristóteles ya hablaba de propóleo y lo consideró como remedio para infección de piel, llagas y supuraciones. Galeno, en el siglo II, menciona el 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.

1.7.2 ORIGEN

El Propóleo es una resina (Imagen 7) 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 5), 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*, (Imagen 6) (Metzner J, et el 1979).



Imagen 5, recolecta de polen y otras sustancias por *Apis mellifera*.

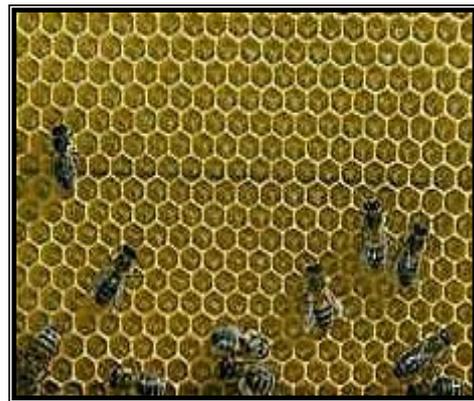


Imagen 6, *Apis mellifera*, secretando Propoleo.



Imagen 7, Propóleo extracto crudo

1.7.3 COMPOSICION

El propóleos tiene materias colorantes, los flavonoides, que son las más activas en la función antiséptica. Además de esta sustancia, contiene resinas y bálsamos (un 50%), cera de abeja (un 30%), aceites esenciales (un 10%), polen y diversos materiales minerales: aluminio, plata, bario, boro, cromo, cobalto, estaño, hierro y muchos otros. También contiene provitamina A y vitaminas del grupo B, especialmente B3. Es muy variable su composición dependiendo de la flora y el clima del lugar. Ya que la colmena, es uno de los lugares mas estudiados, aún no se ha concluido su estudio científico. Se han encontrado 250 elementos constitutivos y unos 50 principios biológicamente activos, lo que explica su gran cantidad de propiedades. (Orsi, R. O., et al. 2005) (Imagen 8)

Su color es variable de negro-café hasta amarillo dependiendo del origen; 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.

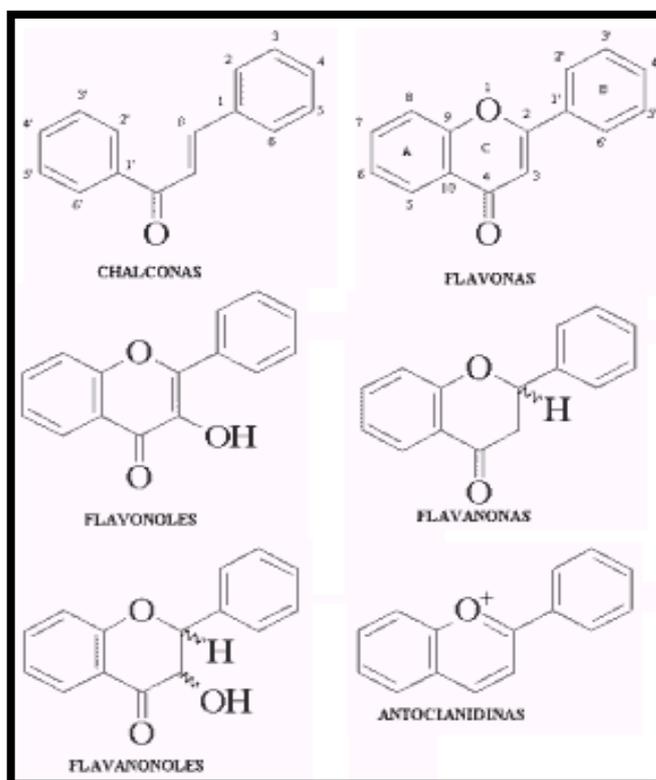


Imagen 8, Compuestos fenólicos de acción farmacológica encontrados en el propoleo.

1.7.4 PROPIEDADES.

Científicamente se le han demostrado más de 20 propiedades: 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. (Mirzoeva O.K., *et al.* 2006).

1.7.5 MECANISMO DE ACCIÓN.

La actividad antimicrobiana del propoleo se le atribuye a sus constituyentes como ácidos aromáticos, compuestos fenólicos, esteroides, especialmente los flavonoides. Por otro lado se reporta que el mecanismo de la actividad antimicrobiana es complicado y se le puede atribuir al sinergismo entre flavonoides, hidroxiácidos y sesquiterpenos. (Metzner J, *et al* 1979).

Pero se ha estudiado el efecto sobre algunos microorganismos. El mecanismo natural del Propóleo sobre la fisiología de los microorganismos *B. subtilis*, *E. coli*, *R. sphaeroides*, presenta un efecto bactericida debido a la presencia de muchas sustancias activas. El efecto bactericida es efectivo contra Gram + y bacterias Gram -. El propoleo y sus componentes cinámicos y flavonoides aportan la energía de transferencia de la membrana citoplasmática, e inhiben la motilidad de la bacteria. (Mirzoeva O.K. *et al.* 1997).

Por métodos colorimétricos y Microscopia electrónica se ha investigado el posible mecanismo de acción antibacterial del Propoleo llevado a cabo en *Streptococcus agalactiae*. Se demostró que el propoleo inhibe el crecimiento de la bacteria; evitando la división de la célula, por consiguiente la formación de *Streptococcus* multicelulares, 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 propóleo es complejo en células bacterianas, ya que no tiene el mismo modo de acción de los antibióticos clásicos.

En la actualidad el propoleo ha tenido una gran importancia en la medicina popular, en particular se ha estudiado el efecto sobre los patógenos orales causantes de infecciones y se han sugerido estas investigaciones para evaluarse clínicamente. *Prevotella intermedia/ Prevotella nigrescences* aisladas y recuperadas de pacientes con periodontitis; estos microorganismos son susceptibles a propoleo como a Penicilina, Eritromicina, Meropenem y Metronidazol. 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. Así como el *Streptococcus mutans* donde el Propoleo inhibe la formación y el desarrollo del Biofilm. (Mirzoeva O.K. *et al.* 1997).

1.7.6 Indicaciones terapéuticas del propóleo.

Afecciones respiratorias: anginas, faringitis, laringitis, gripe, sinusitis, rinitis alérgica traqueítis, bronquitis, asma bronquial, neumonías crónicas, tuberculosis pulmonar, otitis. (Mirzoeva O.K., *et al.* 2006).

Afecciones bucales: aftas, estomatitis, gingivitis, piorrea, parodontosis, glositis (inflamación de la lengua), en dolores después de extracciones dentales.

Afecciones digestivas: colitis aguda y crónica, gastritis y úlceras gastroduodenales, diarreas, disquinesias hepato-biliares. (Metzner J, *et al* 1979)

Afecciones ginecológicas: erosiones cervicales, leucorrea, llagas postoperatorias, vaginitis, Trichomoniasis vaginal, candidiasis, infecciones bacterianas mixtas. (Mirzoeva O.K., *et al.* 2006).

Afecciones urinarias: cistitis, uretritis, prostatitis.

Afecciones tiroideas: bocio difuso, bocio nodal, bocio micótico y bocio congénito. Obesidad asociada a hipotiroidismo.

Afecciones dermatológicas: eczemas crónicos, neurodermitis, úlceras tróficas de la pierna, piodermatitis, para favorecer la cicatrización, heridas actinomicosis, moniliasis e intertrigo de los lactantes (hongos). (Metzner J, *et al* 1979)

Afecciones circulatorias: arterioesclerosis, fragilidad capilar.

Afecciones neurosíquicas: esclerosis en placas, distrofia muscular progresiva, enfermedad de Parkinson, insuficiencia cerebro-vasculares anorexia mental.

Como estimulante de las defensas inmunológicas.

Afecciones oculares: blefaritis (inflamación de párpados) blefaroconjuntivitis alérgica, úlcera de la córnea con iritis, queratopatías. (Mirzoeva O.K., *et al.* 2006).

2. OBJETIVOS

General:

Determinar *in vitro* el efecto inhibitorio del extracto de Propóleo en bacterias aisladas de casos de mastitis bovina utilizando la técnica de Mosmann.

Particulares:

Elaborar un extracto hidroalcohólico de Propóleo estéril.

Liofilizar el extracto de Propóleo para su evaluación en bacterias aisladas de casos de mastitis bovina por medio de la técnica de Mosmann.

Determinar la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) para cada bacteria.

3. HIPÓTESIS.

Si al enfrentar el extracto de propóleo a bacterias aisladas de casos de mastitis y el crecimiento de éstas es inhibido; entonces puede proponerse como una opción para el tratamiento.

4.0 METODOLOGÍA.

4.1 OBTENCIÓN DEL PROPOLEO CRUDO.

Se realizó la recolección del propóleo de los apiarios de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo-4. Obteniéndose 94.0 gramos.

4.2 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO DE PROPÓLEO.

El propóleo se puso en disolución en un volumen de 1000 ml de una solución hidroalcohólica 50:50 (v/v). Se mantuvo en agitación constante a una temperatura no mayor de 56°C. Se dejó evaporar para concentrar la solución hasta obtener un volumen total de 500 ml. Se eliminaron las impurezas por filtración a gravedad. La solución se esterilizó con una membrana de esteres de celulosa de 3, 0.8 y 0.22 µm. Se le realizó la prueba de esterilidad sembrando en una placa de agar BHI e incubando a 37°C por 48 horas.

4.3. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO DE PROPÓLEO LIOFILIZADO.

Con la finalidad de eliminar el etanol que pudiera estar presente en el extracto, se procedió a liofilizarlo. Se colocaron 10 ml del extracto de propóleo en viales estériles de vidrio color ámbar. Al finalizar la liofilización se determinó el peso seco.

4.4. OBTENCIÓN DE BACTERIAS.

Las bacterias utilizadas se aislaron de vacas lecheras de raza Holstein Friesian con diagnóstico clínico de mastitis, en la cuenca lechera de Tizayuca, Hidalgo. Para el traslado de las muestras al laboratorio se utilizaron refrigerantes y caja térmica. Las muestras de leche se sembraron en agar EMB, agar selectivo para estreptococos y agar sangre por 24 horas a 37°C. En este trabajo solo se usaron 10 bacterias ya identificadas previamente, solo se corroboraron con bioquímicas primarias y secundarias. (Koneman Elmer, *et al.* 2001). (Tablas No 2, 3 y 4)

| Tabla No 2 Identificación del Género <i>Streptococcus</i> | | | | | |
|--|---------|----------|----------|----------------|-----------|
| BACTERIA | GRAM | CATALASA | CAMP | BILIS ESCULINA | NaCL 6.5% |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> cepa 1 | COCOS + | Negativa | Positiva | - | - |
| <i>Streptococcus agalactiae</i> cepa 2 | COCOS + | Negativa | Positiva | - | - |
| <i>Streptococcus del Gpo. C cepa 1</i> | COCOS + | Negativa | Negativa | Negativa | - |
| <i>Streptococcus del Gpo. C cepa 2</i> | COCOS + | Negativa | Negativa | Negativa | - |
| <i>Streptococcus del Gpo. C cepa 3</i> | COCOS + | Negativa | Negativa | Negativa | - |
| <i>Streptococcus del Gpo. D enterococo</i> | COCOS + | Negativa | Negativa | Positiva | Positiva |

| Tabla No 3 Identificación del Género <i>Staphylococcus</i> . | | | | |
|--|------------|----------|-----------|-------------|
| BACTERIA | GRAM | CATALASA | COAGULASA | NOVOBIOCINA |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | COCOS + | POSITIVA | POSITIVA | - |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | COCOS + | POSITIVA | NEGATIVA | SENSIBLE |

| Tabla No 4 Identificación de bacterias Gram negativas | | | | | | | |
|---|--------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
| BACTERIA | GRAM | CATALASA | OXIDASA | INDOL | VP | RM | CITRATO |
| <i>Pseudomonas putida</i> | Bacilos - | Positiva | Positiva | - | - | - | - |
| <i>Escherichia Coli</i> | Bacilos - | Positiva | Negativa | Positiva | Negativa | Positiva | Negativa |

Imagen 9 Pruebas para la identificación de *Streptococcus agalactiae*.

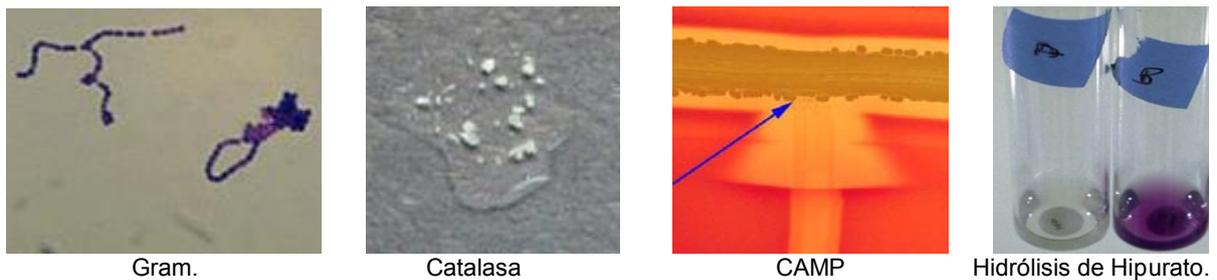


Imagen 10 Pruebas para la identificación de *Streptococcus pyogenes*.

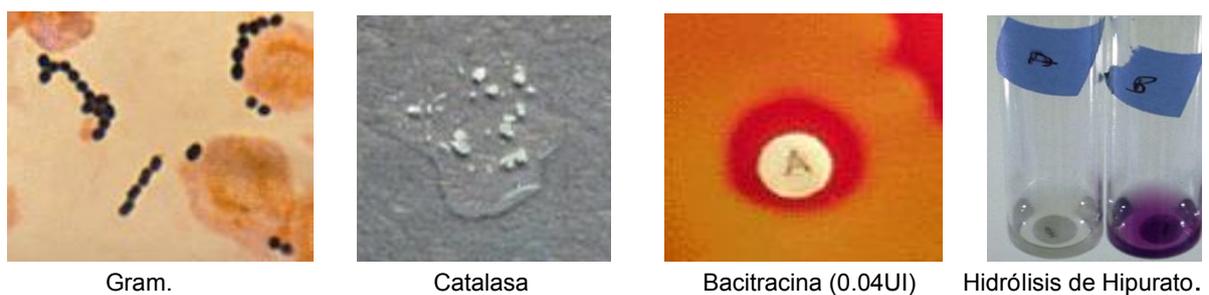


Imagen 11 Pruebas para la identificación de *Staphylococcus aureus*.

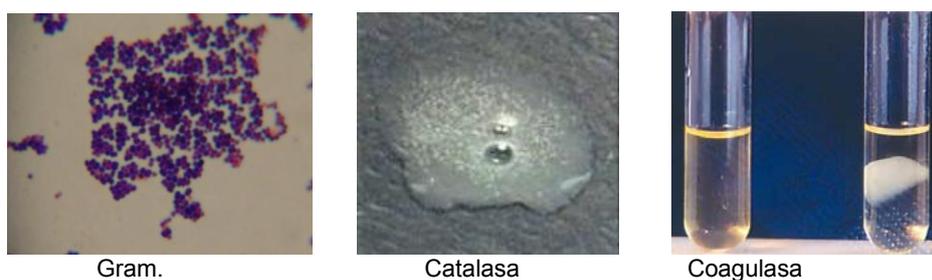
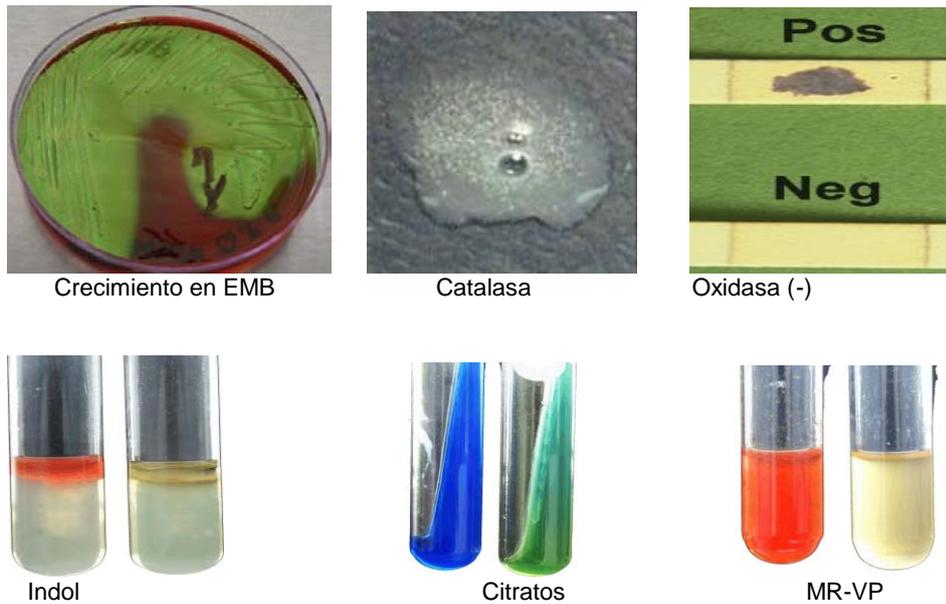


Imagen 12 Pruebas para la identificación de *Escherichia coli*



4.5. ACTIVACIÓN DE CEPAS.

Las cepas a utilizar se mantuvieron en agar Müeller Hinton y agar sangre. Para el ensayo es necesario crecimientos jóvenes para esto se activaron 24 horas antes y se incubaron a $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5$. Las cepas se estandarizaron al 0.5 del nefelómetro de McFarland (1×10^8 UFC/ml) en tubos con 10 ml de caldo BHI estéril.

4.6. ENFRENTAMIENTO BACTERIANO CON EL EXTRACTO DE PROPOLEO.

4.6.1. Se trabajó por duplicado en placas de 96 pozos, enumerando las columnas de 1 a 12.

4.6.2. En la columna 1 se colocaron 100 μl de extracto de propóleo con una concentración de 50 mg/ml y 100 μl de bacterias estandarizadas al 0.5 de McFarland en BHI a doble concentración, para dar un total de 200 μl por pozo y el BHI quede finalmente a concentración normal.

4.6.3. A partir de la columna 2 a la columna 9 se colocaron 100 μl de BHI caldo a doble concentración y se agregaron 100 μl de extracto de propóleo (50 mg/ml). De la columna 2 se pipeteó y se transfirieron 100 μl a la columna 3, quedando la columna 2 con 100 μl y 25 mg/ml y así sucesivamente hasta la columna 9. (Tabla No 5)

4.6.4. Se tiene entonces un rango de concentración de propóleo de 50 – 0.195 mg/ml.

4.6.5. Se añadió 100 μl de bacterias en toda la placa exceptuando las columnas 10 y 12.

4.6.6. A la columna 10 se añadió 100 µl de BHI doble concentración y 100µl de extracto de propóleo (50 mg/ml), esta columna es el Blanco. (Tabla No 5)

4.6.7. La columna 11 se utilizó como control positivo adicionando 100 µl de BHI doble concentración y 100 µl con Bacteria estandarizada.

4.6.8. A la columna 12 se adiciono solo caldo BHI 200 µl, este es el Control negativo.

4.6.9. Se incubo la placa por 24 horas a una temperatura de 37°C.

4.6.10. En toda la placa se adicionaron 10 µl del reactivo de MTT a una concentración de 5 mg/ml. (Tabla No 5)

4.6.11. Se incuba por 3 horas a 37°C.

4.6.12. El alcohol isopropílico se emplea como reactivo de paro añadiéndose 40 µl.

4.6.13. Las lecturas se obtuvieron en un lector por medio de absorbancias a una longitud de onda de 570 nm.

Esquema de trabajo sobre la microplaca. Se realizaron 2 ensayos para cada bacteria.

| Tabla No 5. Esquema de trabajo en placa de cultivo celular. | | | | | | | | | | | | |
|---|-----|-----|------|------|------|------|------|------|------|-----|-----|-----|
| | C1 | C2 | C3 | C4 | C5 | C6 | C7 | C8 | C9 | C10 | C11 | C12 |
| Propóleo (mg/ml) | 50 | 25 | 12.5 | 6.25 | 3.12 | 1.56 | 0.78 | 0.39 | 0.19 | 50 | NA | NA |
| Bacteria * (µl) | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 0 | 100 | 0 |
| Reactivo MTT ** (µl) | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Incubar por 3 horas a 37°C | | | | | | | | | | | | |
| Acido isopropílico 0.1N (µl) | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 | 40 |
| Leer lector de ELISA a una $\lambda = 570$ nm. | | | | | | | | | | | | |

Columna 10: Blanco (B). 100 µl BHI doble concentración y 100 µl de extracto de propóleo (50 mg/ml).

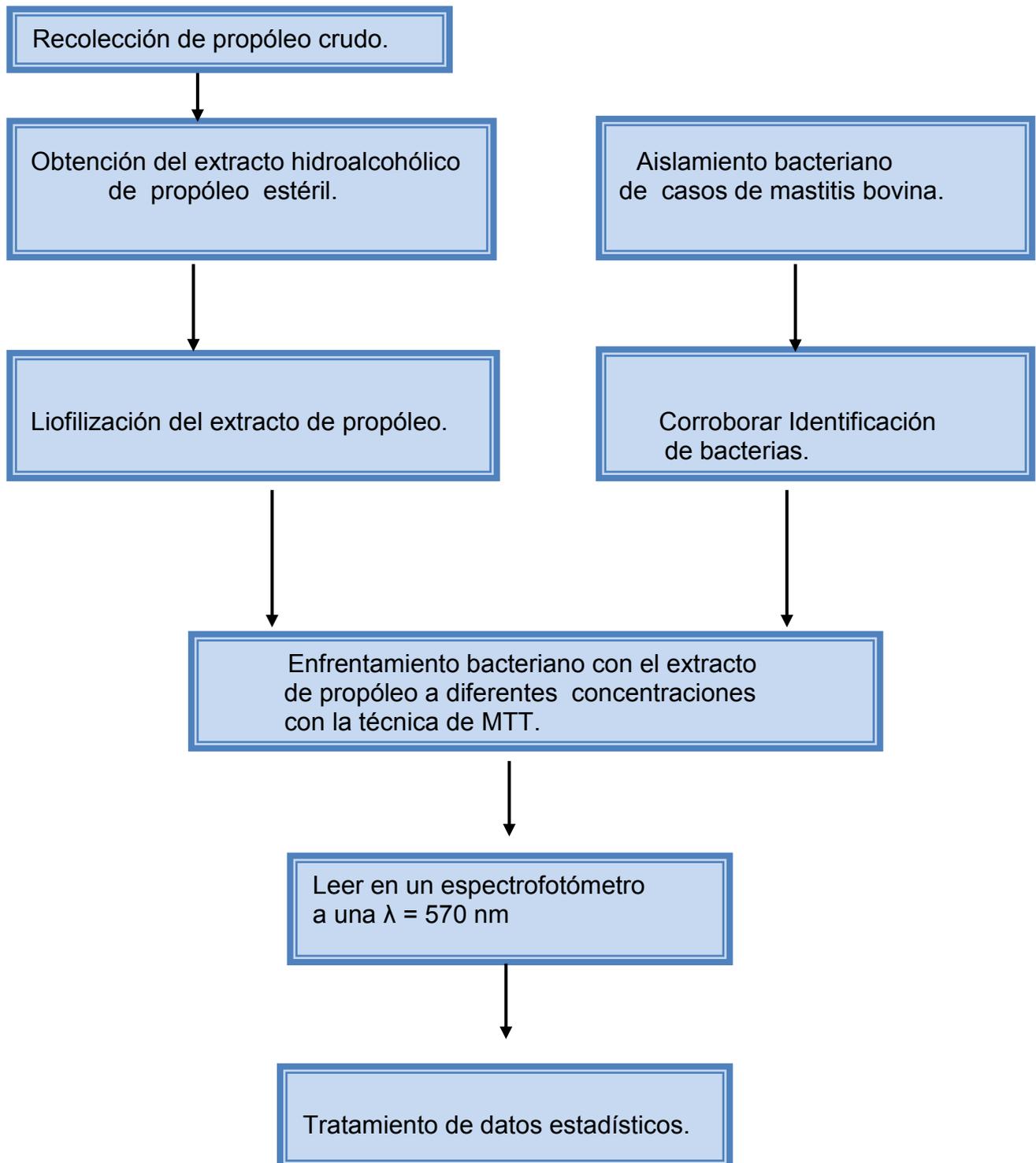
Columna 11: Control positivo. 100 µl de BHI doble concentración y 100 µl de bacteria estandarizada al 0.5 del Nefelómetro de McFarland.

Columna 12: Control negativo (C). 100 µl de caldo BHI doble concentración y 100 µl de SSF estéril.

*Bacteria estandarizada al 0.5 del Nefelómetro de McFarland.

**Reactivo MTT a una concentración de 5 mg.

4.7. DIAGRAMA DE TRABAJO GENERAL.



5.0. Resultados.

Se logro obtener un extracto hidroalcohólico de propóleo estéril, se liofilizo para tenerlo en peso seco y así poder manejar un rango de concentraciones conocidas que van de 50 a 0.195mg/ml.

Se trabajo con 10 bacterias ya aisladas e identificadas, solo se corroboraron estas. El 80 % de las bacterias son Gram positivas: dos especies de *Staphylococcus* y seis especies de *Streptococcus*; el 20 % restante son Gram negativas: *Pseudomonas putida* y *Escherichia coli*. Los resultados se expresaron en gráficos de porcentaje de crecimiento en función de las concentraciones de propóleo.

Todas las bacterias presentan inhibición dependiendo de la susceptibilidad de las mismas. Uno de los objetivos es encontrar la Concentración Mínima Inhibitoria para cada bacteria, ésta se obtuvo por medio de la prueba estadística de la t de Student bilateral (ver Apéndice A-1); la cual demuestra que existe una diferencia significativa entre la media del control positivo y la media de la concentración analizada. La prueba se realizo con dos grados de libertad y un error de significación (α) de 0.05. Los resultados se presentan en la tabla No 16.

5.1. Resultados de *Staphylococcus aureus*.

Se muestra que la inhibición producida por el propóleo en *Staphylococcus aureus* es buena a concentraciones mayores de 6.25 mg/ml, (Grafico 1) a partir de ésta se ve el aumento del crecimiento igualando prácticamente el control positivo. Las variaciones que se observan después de ésta concentración son errores de la técnica. El análisis estadístico indica que la MIC de propóleo es de 6.25 mg/ml produciendo un efecto inhibitorio del 77.68 %. (Tabla No 6)

| Tabla No 6. Porcentaje de crecimiento de <i>Staphylococcus aureus</i> en diferentes concentraciones de propóleo. | | | | | | | | | | | | |
|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|-----------|-----------|
| Propóleo (mg/ml) | 50 | 25 | 12.5 | 6.25 | 3.12 | 1.56 | 0.78 | 0.39 | 0.195 | Blanco | Control + | Control - |
| Absorbancia | 0.265 | 0.273 | 0.309 | 0.693 | 2.346 | 2.456 | 2.504 | 1.797 | 1.560 | 0.035 | 2.329 | 0.321 |
| | 0.24 | 0.276 | 0.322 | 0.399 | 1.948 | 1.943 | 1.852 | 1.764 | 1.522 | 0.036 | 2.564 | 0.311 |
| Abs promedio | 0.253 | 0.275 | 0.316 | 0.546 | 2.147 | 2.200 | 2.178 | 1.781 | 1.541 | 0.036 | 2.447 | 0.316 |
| % Crecimiento | 10.32 | 11.22 | 12.90 | 22.32 | 87.76 | 89.90 | 89.03 | 72.78 | 62.99 | 1.45 | 100.00 | 12.92 |

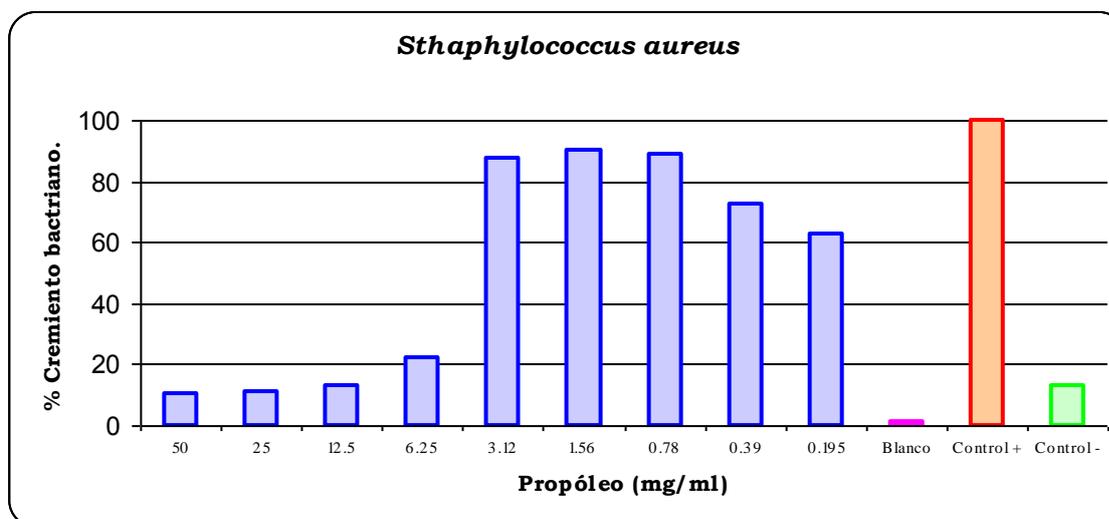


Grafico No1. Crecimiento bacteriano del *Staphylococcus aureus* en presencia de extracto de propóleo en diferentes concentraciones.

5.2. Resultados de *Staphylococcus epidermidis*.

Staphylococcus epidermidis presenta resistencia al propóleo en todo el rango de concentraciones, pero aun así su crecimiento se ve inhibido por debajo del 50 % en algunos puntos, siendo semejante o inferiores al control negativo. (Gráfico 2), a simple vista la asignación de la MIC sería para la concentración de 50 o 25 mg/ml porque se tiene un crecimiento del 29.93 y 30.21 respectivamente, pero el análisis da resultados diferentes ya que ninguna concentración entra en el rango de aceptación que considera la prueba, es decir que estadísticamente todas las medias de las concentraciones son significativamente iguales a la del control positivo. (Tabla No 7)

| Tabla No 7 Porcentaje crecimiento de <i>Staphylococcus epidermidis</i> en diferentes concentraciones de propóleo. | | | | | | | | | | | | |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|-----------|-----------|
| Propóleo (mg/ml) | 50 | 25 | 12.5 | 6.25 | 3.12 | 1.56 | 0.78 | 0.39 | 0.195 | Blanco | Control + | Control - |
| Absorbancia | 0.392 | 0.352 | 0.371 | 0.788 | 0.315 | 0.532 | 0.449 | 0.380 | 0.548 | 0.034 | 1.817 | 0.542 |
| | 0.259 | 0.305 | 0.427 | 0.253 | 0.614 | 0.545 | 0.648 | 0.677 | 0.483 | 0.038 | 0.358 | 0.356 |
| Abs promedio | 0.326 | 0.329 | 0.399 | 0.521 | 0.465 | 0.539 | 0.549 | 0.529 | 0.516 | 0.036 | 1.088 | 0.449 |
| % Crecimiento | 29.93 | 30.21 | 36.69 | 47.86 | 42.71 | 49.52 | 50.44 | 48.60 | 47.40 | 3.31 | 100 | 41.29 |

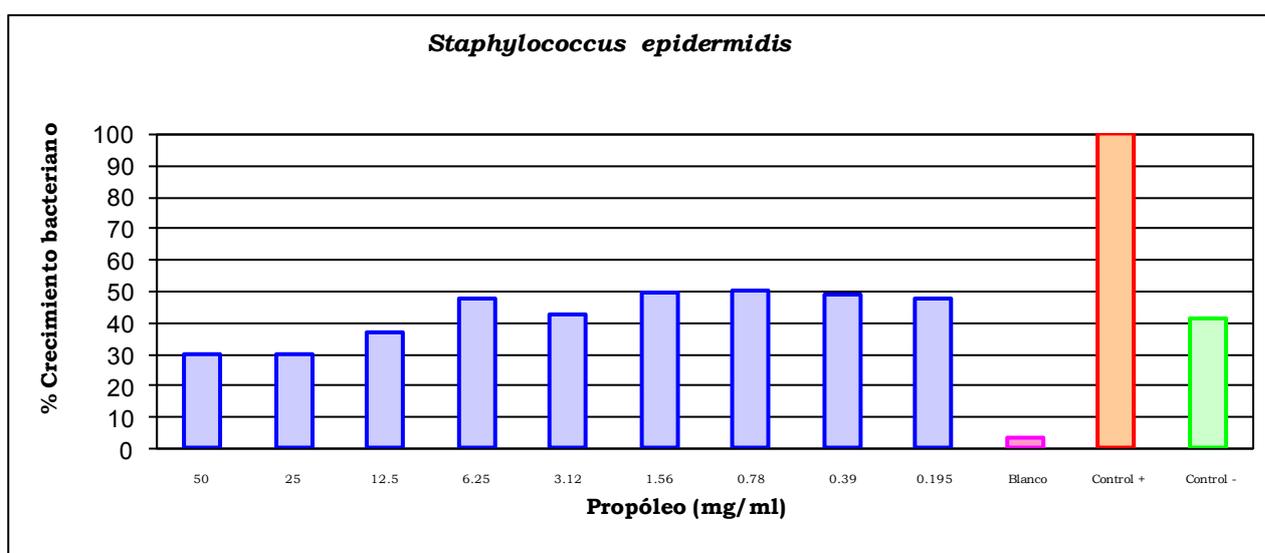


Gráfico No 2. Crecimiento bacteriano del *Staphylococcus epidermidis* en presencia de extracto de propóleo en diferentes concentraciones.

5.3. Resultados de *Streptococcus agalactiae* cepa 1.

El crecimiento de *Streptococcus agalactiae* se ve inhibido solo en la primera concentración hasta el 20 %, en las restantes el crecimiento se asemeja al control positivo, (Grafico 3) indicando que éste *Streptococcus* es resistente al propóleo a concentraciones menores de 50 mg/ml de propóleo, por lo que ésta es su MIC. (Tabla No 8)

| Tabla No 8. Porcentaje de crecimiento de <i>Streptococcus agalactiae</i> * cepa 1 en diferentes concentraciones de propóleo. | | | | | | | | | | | | |
|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|-----------|-----------|
| Propóleo (mg/ml) | 50 | 25 | 12.5 | 6.25 | 3.12 | 1.56 | 0.78 | 0.39 | 0.195 | Blanco | Control + | Control - |
| Absorbancias | 0.523 | 1.659 | 1.997 | 1.898 | 1.848 | 1.844 | 1.696 | 1.554 | 1.896 | 0.036 | 2.178 | 0.523 |
| | 0.350 | 1.540 | 1.755 | 1.852 | 1.919 | 1.854 | 1.743 | 1.856 | 1.566 | 0.040 | 2.009 | 0.356 |
| Media | 0.437 | 1.600 | 1.876 | 1.875 | 1.884 | 1.849 | 1.720 | 1.705 | 1.731 | 0.038 | 2.094 | 0.440 |
| % Crecimiento | 20.85 | 76.40 | 89.61 | 89.56 | 89.97 | 88.32 | 82.14 | 81.44 | 82.68 | 1.82 | 100 | 20.99 |

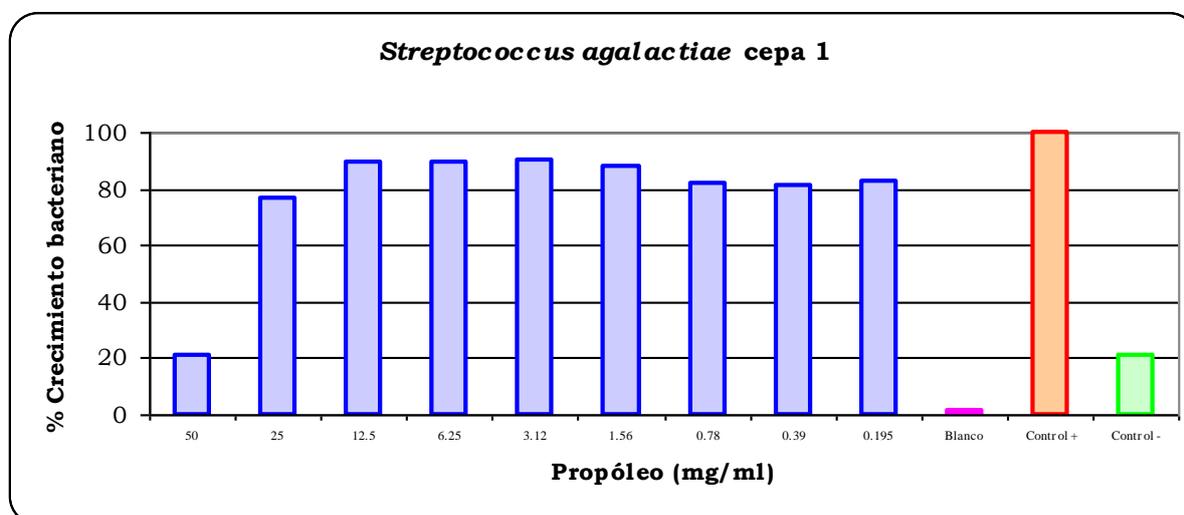


Grafico No3. Crecimiento bacteriano del *Streptococcus agalactiae* cepa 1 en presencia de extracto de propóleo en diferentes concentraciones.

5.4. Resultados de *Streptococcus agalactiae* cepa 2.

El crecimiento bacteriano de *Streptococcus agalactiae* se eleva a concentraciones inferiores de 3.12 mg/ml llegando a superar el control positivo en la concentración de 0.39 mg. (Tabla No 9). La cepa es sensible a concentraciones altas, observándose una disminución del crecimiento hasta un 16 %. En este caso puede decirse que el crecimiento es inversamente proporcional a la concentración del propóleo. A pesar de que a 3.12 mg/ml de propóleo se produce una inhibición de 47.53 % que es casi el doble del crecimiento de la concentración que le antecede, la prueba estadística indica que su media si es significativa y se toma a ésta concentración como la mínima inhibitoria. (Grafico 4)

| Tabla No 9. Porcentaje de crecimiento de <i>Streptococcus agalactiae</i> *cepa 2 en diferentes concentraciones de propóleo. | | | | | | | | | | | | |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|--------|-----------|-----------|
| Propóleo (mg/ml) | 50 | 25 | 12.5 | 6.25 | 3.12 | 1.56 | 0.78 | 0.39 | 0.195 | Blanco | Control + | Control - |
| Absorbancia | 0.297 | 0.355 | 0.408 | 0.471 | 0.465 | 1.665 | 2.165 | 1.933 | 1.137 | 0.034 | 1.658 | 0.278 |
| Abs promedio | 0.297 | 0.284 | 0.502 | 0.468 | 1.216 | 1.479 | 1.263 | 1.753 | 1.599 | 0.036 | 1.879 | 0.242 |
| % Crecimiento | 16.79 | 16.06 | 28.39 | 26.55 | 47.53 | 88.89 | 96.92 | 104.21 | 77.35 | 1.98 | 100.00 | 14.70 |

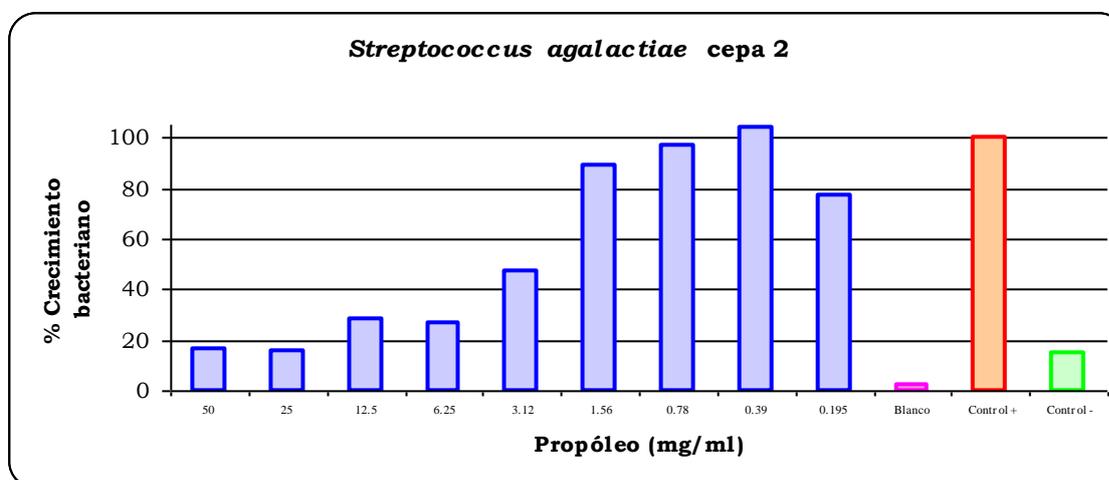


Gráfico No 4. Crecimiento bacteriano de *Streptococcus agalactiae* cepa 2 en presencia del extracto de propóleo a diferentes concentraciones.

5.5. Resultados de *Streptococcus* del Grupo C cepa 1.

El crecimiento mantiene una relación inversamente proporcional a la concentración del propóleo, ningún crecimiento supero el control positivo. (Grafico 5) En el rango de concentraciones de 1.56 a 0.195 mg/ml de propóleo se observa que el crecimiento se mantiene en valores cercanos al 65 %. Estadísticamente la MIC es de 3.12 mg/ml de propóleo, porque el valor de t calculada es de 4.33 comparada con la t tablas que es de 4.3027 su diferencia es mínima, para asegurarnos que se produzca el efecto inhibitorio se toma la concentración anterior que tiene una t calculada de 5.15 siendo que el valor se encuentra en el rango de rechazo. (Tabla No 10)

| Tabla No 10. Porcentaje de crecimiento de <i>Streptococcus</i> Gpo C *cepa 1 en diferentes concentraciones de propóleo. | | | | | | | | | | | | |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|-----------|-----------|
| Propóleo (mg/ml) | 50 | 25 | 12.5 | 6.25 | 3.12 | 1.56 | 0.78 | 0.39 | 0.195 | Blanco | Control + | Control - |
| Absorbancia | 0.432 | 1.128 | 0.790 | 1.056 | 1.142 | 1.971 | 1.758 | 2.029 | 2.201 | 0.039 | 2.158 | 0.355 |
| | 0.509 | 0.658 | 1.253 | 1.056 | 1.465 | 1.758 | 1.891 | 1.879 | 1.220 | 0.036 | 3.556 | 0.394 |
| Media | 0.471 | 0.893 | 1.022 | 1.056 | 1.304 | 1.865 | 1.825 | 1.954 | 1.711 | 0.038 | 2.857 | 0.375 |
| % Crecimiento | 16.47 | 31.26 | 35.75 | 36.96 | 45.62 | 65.26 | 63.86 | 68.39 | 59.87 | 1.31 | 100 | 13.11 |

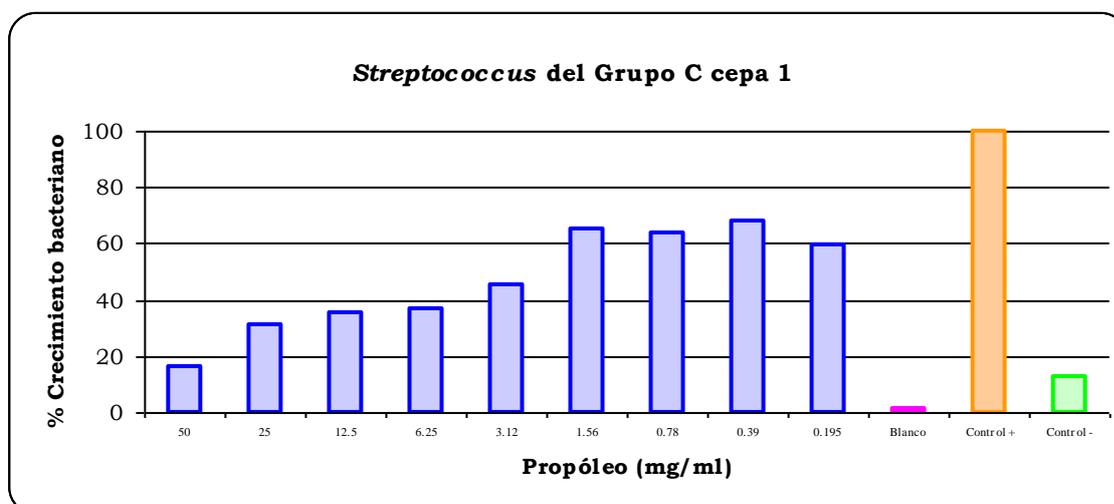


Gráfico No 5. Crecimiento bacteriano de *Streptococcus* del Grupo C cepa 1 en presencia del extracto de propóleo a diferentes concentraciones.

5.6. Resultados de *Streptococcus* del Grupo C cepa 2.

El *Streptococcus* es resistente a concentraciones menores de 12.5 mg/ml, teniendo a partir de ésta un crecimiento mayor al 80 %, (Gráfico 6) solo se observa inhibición en las dos primeras concentraciones. La MIC es de 50 mg/ml de propóleo. (Tabla No 11)

| Tabla No 11. Porcentaje de crecimiento de <i>Streptococcus</i> del Gpo C *cepa 2 en diferentes concentraciones de propóleo. | | | | | | | | | | | | |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|-----------|-----------|
| Propóleo (mg/ml) | 50 | 25 | 12.5 | 6.25 | 3.12 | 1.56 | 0.78 | 0.39 | 0.19 | Blanco | Control + | Control - |
| Absorbancia | 0.435 | 0.639 | 1.242 | 1.584 | 1.681 | 1.826 | 1.856 | 2.314 | 1.990 | 0.048 | 1.897 | 0.312 |
| | 0.389 | 0.507 | 1.334 | 1.487 | 1.487 | 1.803 | 1.734 | 1.208 | 1.446 | 0.036 | 1.754 | 0.398 |
| Absorbancia promedio | 0.412 | 0.573 | 1.288 | 1.536 | 1.584 | 1.815 | 1.795 | 1.761 | 1.718 | 0.042 | 1.826 | 0.355 |
| % Crecimiento | 22.57 | 31.39 | 70.56 | 84.11 | 86.77 | 99.40 | 98.33 | 96.47 | 94.11 | 2.30 | 100 | 19.45 |

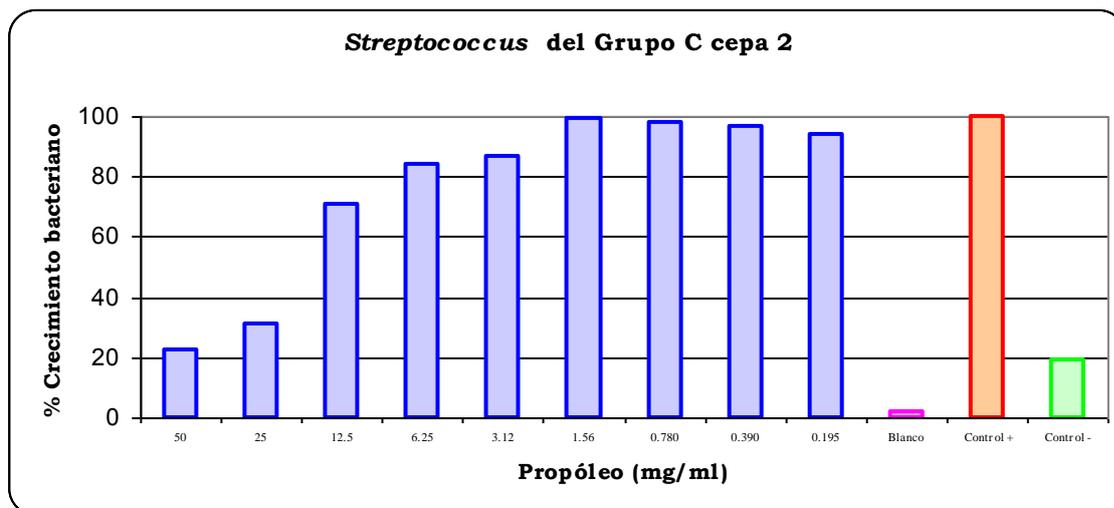


Gráfico No 6. Crecimiento bacteriano de *Streptococcus* del Grupo C cepa 2 en presencia del extracto de propóleo a diferentes concentraciones.

5.7. Resultados de *Streptococcus* del Grupo C cepa 3.

La inhibición del crecimiento sobre éste estreptococo, se observa claramente en las concentración de 50 a 1.56 mg/ml, en tres de éstas se encuentran por debajo del crecimiento registrado para el control negativo.(Grafico 7) Se produce efecto de inhibición en las concentraciones siguientes, pero éste es reducido casi al 50 %. La MIC es de 1.56 mg/ml de propóleo. (Tabla No 12)

| Tabla No 12. Porcentaje de crecimiento del <i>Streptococcus</i> Grupo c * cepa 3 en presencia de diferentes concentraciones de propóleo. | | | | | | | | | | | | |
|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|--------|-----------|-----------|
| Propóleo (mg/ml) | 50 | 25 | 12.5 | 6.25 | 3.12 | 1.56 | 0.78 | 0.390 | 0.195 | Blanco | Control + | Control - |
| Absorbancia | 0.241 | 0.035 | 0.319 | 0.484 | 0.050 | 0.751 | 1.56 | 2.296 | 1.976 | 0.035 | 2.589 | 0.52 |
| | 0.327 | 0.275 | 0.403 | 0.516 | 0.990 | 0.134 | 1.107 | 0.3715 | 1.827 | 0.035 | 2.374 | 0.3165 |
| Abs promedio | 0.284 | 0.155 | 0.361 | 0.500 | 0.520 | 0.443 | 1.334 | 1.334 | 1.902 | 0.035 | 2.482 | 0.418 |
| % Crecimiento | 11.44 | 6.25 | 14.55 | 20.15 | 20.96 | 17.83 | 53.74 | 53.75 | 76.63 | 1.41 | 100 | 16.85 |

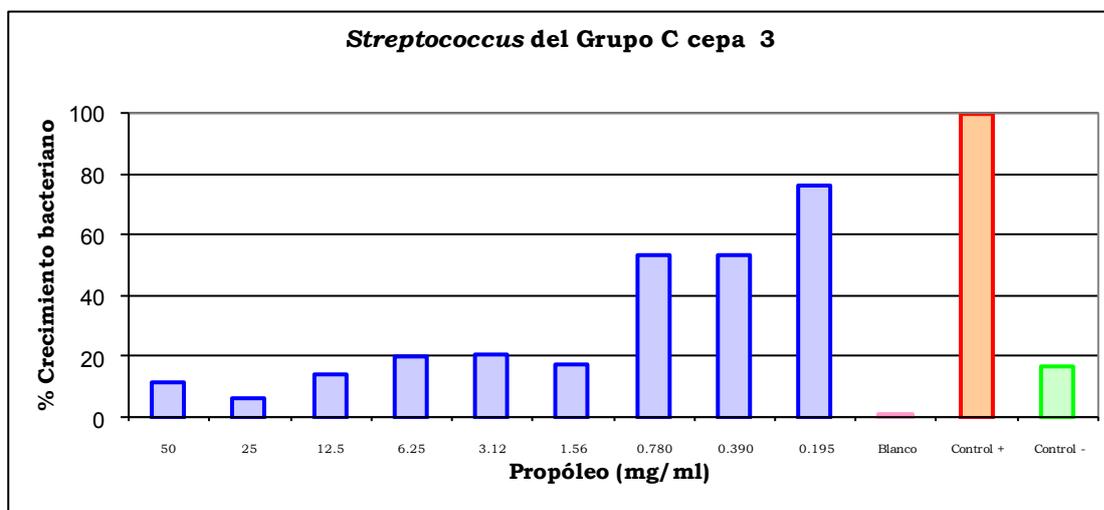


Gráfico No 7. Crecimiento bacteriano de *Streptococcus* del Grupo C cepa 3 en presencia del extracto de propóleo a diferentes concentraciones.

5.8. Resultados de *Streptococcus* del Grupo D enterococo.

Este estreptococo sigue una tendencia proporcional, se tienen crecimientos reducidos en concentraciones mayores de 6.25 mg/ml de propóleo (Grafico 8), observándose un crecimiento inferior al 40 %, después éste se aumenta hasta el 100 % en la última concentración. La MIC es de 3.12 mg/ml de propóleo. (Tabla No 13)

| Tabla No 13. Porcentaje de crecimiento del <i>Streptococcus</i> Gpo D enterococo en diferentes concentraciones de propóleo. | | | | | | | | | | | | |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|-----------|-----------|
| Propóleo (mg/ml) | 50 | 25 | 12.5 | 6.25 | 3.12 | 1.56 | 0.78 | 0.39 | 0.195 | Blanco | Control + | Control - |
| Absorbancia | 0.456 | 0.462 | 0.569 | 0.762 | 0.644 | 1.113 | 1.117 | 1.544 | 1.659 | 0.041 | 1.482 | 0.272 |
| | 0.364 | 0.693 | 0.63 | 0.452 | 0.698 | 1.024 | 1.352 | 1.092 | 1.669 | 0.035 | 1.867 | 0.236 |
| Abs promedio | 0.410 | 0.578 | 0.600 | 0.607 | 0.671 | 1.069 | 1.235 | 1.318 | 1.664 | 0.038 | 1.675 | 0.254 |
| % Crecimiento | 24.48 | 34.49 | 35.80 | 36.25 | 40.07 | 63.81 | 73.72 | 78.71 | 99.37 | 2.27 | 100 | 15.17 |

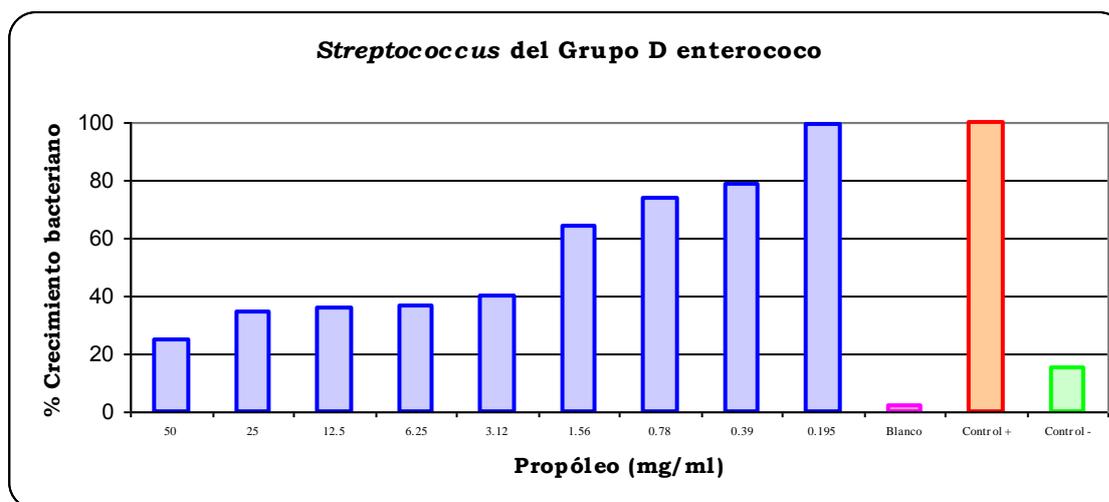


Gráfico No 8. Crecimiento bacteriano de *Streptococcus* del Grupo D enterococo en presencia del extracto de propóleo a diferentes concentraciones.

5.9. Resultados de *Pseudomonas putida*.

El crecimiento de la *Pseudomonas putida* se ve disminuido notoriamente por debajo de un 40 % en las cinco primeras concentraciones, (Grafico 9) después se observa su incremento gradual, alcanzando el valor del control positivo. La MIC es de 12.5 mg/ml de propóleo. (Tabla 14)

| Tabla No 14. Porcentaje de crecimiento del <i>Pseudomonas putida</i> en diferentes concentraciones de propóleo. | | | | | | | | | | | | |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|-----------|-----------|
| Propóleo (mg/ml) | 50 | 25 | 12.5 | 6.25 | 3.12 | 1.56 | 0.78 | 0.39 | 0.195 | Blanco | Control + | Control - |
| Absorbancia | 0.29 | 0.327 | 0.72 | 1.523 | 1.487 | 1.931 | 2.082 | 2.429 | 2.51 | 0.032 | 1.985 | 0.32 |
| Abs promedio | 0.316 | 0.334 | 0.399 | 1.519 | 1.566 | 1.283 | 1.945 | 2.105 | 1.985 | 0.032 | 2.630 | 0.25 |
| % Crecimiento | 24.48 | 34.49 | 35.80 | 36.25 | 40.07 | 63.81 | 73.72 | 78.71 | 99.37 | 2.27 | 100.00 | 15.17 |

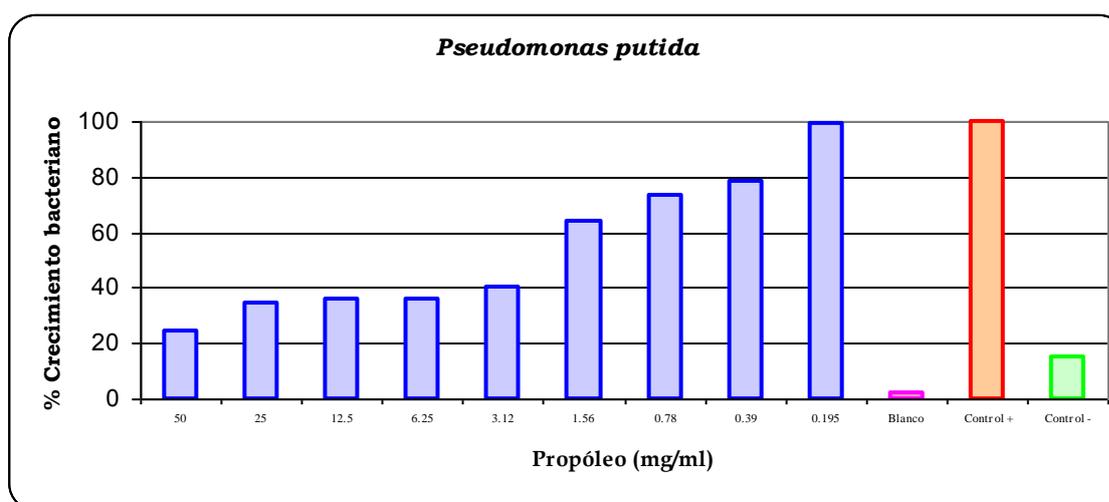


Gráfico No 9. Crecimiento bacteriano de *Pseudomonas putida* en presencia del extracto de propóleo a diferentes concentraciones.

5.10. Resultados de *Escherichia coli*.

A partir de la quinta concentración el crecimiento se ve aumentado hasta un 63.81 % llegando al 100 % en la concentración de 0.195 mg/ml de propóleo. (Gráfico 10) La *Escherichia coli* es una bacteria sensible al propóleo a concentraciones mayores. La MIC es de 6.25 mg/ml de propóleo. (Tabla 15)

| Tabla No 15. Porcentaje de crecimiento del <i>Escherichia coli</i> en diferentes concentraciones de propóleo. | | | | | | | | | | | | |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|-----------|-----------|
| Propóleo (mg/ml) | 50 | 25 | 12.5 | 6.25 | 3.12 | 1.56 | 0.78 | 0.39 | 0.195 | Blanco | Control + | Control - |
| Absorbancias | 0.356 | 0.6 | 0.842 | 1.014 | 0.730 | 0.743 | 1.595 | 1.332 | 1.562 | 0.032 | 1.718 | 0.238 |
| | 0.247 | 0.962 | 1.001 | 1.179 | 1.203 | 1.276 | 1.753 | 1.832 | 1.608 | 0.0325 | 1.836 | 0.27 |
| Abs promedio | 0.302 | 0.781 | 0.922 | 1.097 | 1.087 | 1.010 | 1.674 | 1.761 | 1.82 | 0.032 | 2.12 | 0.254 |
| % Crecimiento | 24.48 | 34.49 | 35.80 | 36.25 | 40.07 | 63.81 | 73.72 | 78.71 | 99.37 | 2.27 | 100.00 | 15.17 |

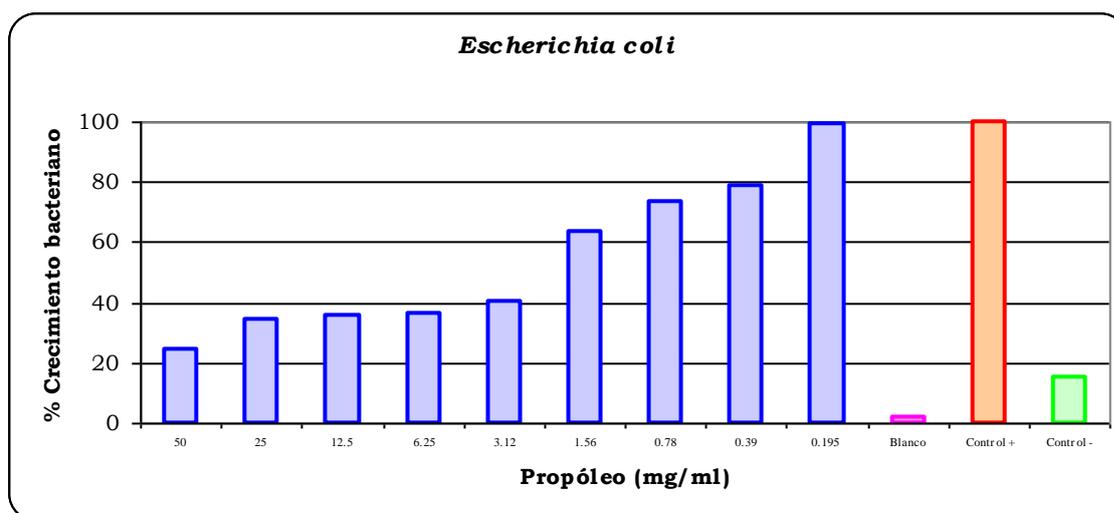


Gráfico No 10. Crecimiento bacteriano de *Escherichia coli* en presencia del extracto de propóleo a diferentes concentraciones.

5.11. Prueba de t de Student.

Ho: $\mu_1 = \mu_2$ La media de la MIC es igual a la media del control positivo.

Ho: $\mu_1 \neq \mu_2$ La media de la MIC es diferente a la media del control positivo.

Ho se acepta si: $- 4.3027 \leq t \text{ calculada} \leq 4.3027$

gl = $(n_1 + n_2) - 2 = 2$
 $\alpha/2 = 0.025$
 $1 - \alpha/2 = 0.975$
 ttablas = 4.3027

$$t_{\text{calculada}} = \frac{x_1 - x_2}{\sqrt{s_1/2 + s_2/2}}$$

| Tabla No 16. Concentración Mínima Inhibitoria de propóleo para cada bacteria. | | | | |
|---|---|------------------|------------|---------------|
| Gráficos | Bacterias | MIC | tcalculada | Conclusión |
| | | propóleo (mg/ml) | | |
| 1 | <i>Staphylococcus aureus</i> | 6.25 | 10.9 | Ho se rechaza |
| 2 | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | 0.195 | ----- | ----- |
| 3 | <i>Streptococcus agalactiae cepa 1</i> | 50.0 | 13.76 | Ho se rechaza |
| 4 | <i>Streptococcus agalactiae cepa 2</i> | 3.12 | 7.73 | Ho se rechaza |
| 5 | <i>Streptococcus del Gpo C cepa 1</i> | 6.25 | 5.15 | Ho se rechaza |
| 6 | <i>Streptococcus del Gpo C cepa 2</i> | 50.0 | 18.82 | Ho se rechaza |
| 7 | <i>Streptococcus del Gpo C cepa 3</i> | 1.56 | 19.12 | Ho se rechaza |
| 8 | <i>Streptococcus del Gpo D enterecoco</i> | 6.12 | 8.57 | Ho se rechaza |
| 9 | <i>Pseudomonas putida</i> | 12.5 | 4.85 | Ho se rechaza |
| 10 | <i>Escherichia coli</i> | 12.5 | 8.55 | Ho se rechaza |

6.0 DISCUSIÓN.

El tratamiento de las mastitis con fármacos genera una resistencia progresiva de las bacterias patógenas, además dejan residuos químicos en los productos de origen animal. Por esto es importante desarrollar métodos alternativos de control biológico que permitan dar un tratamiento eficaz, adaptable y económico.

El propóleo es una alternativa natural y efectiva, ya que tiene un efecto inhibitor sobre el crecimiento de las bacterias que se aislaron de los casos de mastitis.

Se lograron aislar 10 bacterias, entre las cuales se encontraron las más representativas en éste diagnóstico como son *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, además de bacterias Gram negativas como *Pseudomonas putida* y *Escherichia coli*. Para todas las bacterias el propóleo causa inhibición en el crecimiento.

Staphylococcus aureus disminuye su crecimiento con la adición del propóleo a concentraciones altas (6.25 mg/ml), mientras que *Staphylococcus epidermidis* mantiene un crecimiento uniforme en todo el rango de concentraciones (0.195 a 50 mg/ml); mostrando que *S. aureus* es más resistente que *S. epidermidis*. (Lu et al en 2005) desarrollaron un trabajo en el cual usan propóleo a diferentes concentraciones para determinar la MIC y la MBC, en el primer caso con una concentración de 60 µg/ml y en la segunda de 120 µg/ml, con estas mostraron ambos efectos. El uso de un extracto etanólico al 80% les dio resultados muy satisfactorios, en comparación con el trabajo que realizamos nosotros, en el cual usamos una concentración de 6.25mg/ml (6250µg/ml) pero libre de etanol (por medio de liofilización), creemos que la presencia de etanol al 80% en el trabajo de (Lu et al. 2005) puede estar contribuyendo a la actividad antimicrobiana que encontró. Por otro lado (Enzo et al 2007), uso 15 diferentes propóleos argentinos con una concentración de 14.6 +/- 6mg y demostró que inhibe a *Escherichia Coli* y lo propone como un conservador de alimentos. La concentración de propoleo usada por Enzo está más acorde con la utilizada por nosotros.

Para los estreptococos analizados el comportamiento es igual, solo que algunos muestran mayor resistencia que otros. *S. agalactiae cepa 2* y *S. del Grupo C cepa 3* y *cepa 1* tienen mayor inhibición en las cinco primeras concentraciones. *S. agalactiae cepa 1*, *S. del Grupo C cepa 2* y *S. del Grupo D*, son resistentes a concentraciones altas en el rango utilizado.

En el caso de las bacterias Gram negativas se mantiene el mismo comportamiento de inhibición a concentraciones mayores, solo que es más marcado para *E.coli* que para *Pseudomonas putida*.

En el análisis para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) se demostró que no era suficiente observar el cambio del crecimiento bacteriano en una escala de concentraciones conocidas; sino que necesitábamos eliminar los datos que podrían causar un error para la determinación de la dosis adecuada. Para esto utilizamos la prueba estadística de la t de Student la cual se explica en el Apéndice A.

Se tiene como premisa que la media del control positivo tiene que ser significativamente diferente a la media de la concentración analizada. La prueba da un rango para aceptar o rechazar los valores experimentales. En este caso la $t_{calculada}$ es de 4.33 es decir que el rango es $-4.3027 \leq \mu_0 \leq 4.3027$. Los resultados se muestran en la tabla No 16.

En investigaciones anteriores la determinación de la MIC para el propóleo se realizó por difusión y dilución en agar; para ambos los resultados pueden variar debido a factores físicos y químicos propios del medio, además la difusión al ser un proceso continuo y la inestabilidad del gradiente de concentración durante la experimentación hace que los resultados puedan verse alterados. Así lo reporta (K. Bosio et al, 2000) en su estudio del propóleo sobre el *Streptococcus pyogenes* ya que empleó la difusión en agar y reporta que el extracto presentó una difusión irregular.

Por las desventajas que presentan las técnicas anteriores, recurrimos a la técnica de microdilución en placas de 96 pozos usando el reactivo MTT o 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (solución color amarillo) donde se reduce el anillo de tetrazolium por deshidrogenasas bacterianas y se produce el formazan de color morado (reducido). Así la prueba se vuelve cualitativa por simple inspección al producir un cambio de color del reactivo, ya que el color amarillo nos indica la ausencia de microorganismos y el color morado su viabilidad. Por otro lado se obtienen resultados cuantitativos, con el material disuelto y medido espectrofotométricamente, produciendo una absorbancia que está en función del colorante convertido.

Nosotros consideramos que el número de bacterias analizadas debería ampliarse para tener resultados más confiables, además deberíamos estudiar las bacterias aisladas de otras cuencas, para tener un análisis que incluya varias regiones de nuestro país ya que la significancia de lo que pasa en la cuenca lechera de Tizayuca seguramente que no es lo que pasa por ejemplo en la zona de la laguna en Torreón.

Para determinar la concentración mínima inhibitoria y la concentración mínima bactericida se debe sembrar de cada uno de los pozos una asada en un medio que no contenga el extracto de propóleo para poder determinar dichos efectos.

Como lo hizo (Enzo et al 2007), probando 15 diferentes propóleos argentinos en este trabajo deberíamos comparar propóleos de diferentes regiones de México y otra variable podrían ser las diferentes estaciones en las que se recolecta.

En cuanto a las técnicas de laboratorio ampliar a microscopía electrónica, lo que nos permitiría analizar el efecto sobre la pared celular ya sea por la formación de protoplastos o esferoplastos, antecedentes inequívocos de la lisis que sufrirían las bacterias. La tinción con bromuro de etidio nos arrojaría el daño a los ácidos nucleicos y finalmente la tinción con azul de toluidina nos evidenciaría el daño a la membrana celular.

Las razones por las que no se sometieron las bacterias a estas técnicas fueron tiempo y dinero.

El propóleo con más estudios podría proponerse como una posible alternativa para el tratamiento de mastitis bovina. Además de que abre opciones para investigaciones sobre las demás propiedades del propóleo.

7.0. CONCLUSIONES.

- ✓ Se obtuvo un extracto de propóleo estéril y libre de alcohol.
- ✓ Se demostró el efecto inhibitorio del propóleo sobre todas las bacterias aisladas de casos de mastitis bovina por medio de la técnica de Mosmann.
- ✓ Se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria del extracto de propóleo para cada bacteria estudiada.
- ✓ La técnica de Mosmann es muy precisa, pero por los reactivos, aparatos y materiales resulta ser costosa.

8. 0. APÉNDICE.

A.1 Prueba de t de Student.

Siguiendo la hipótesis propuesta de observar si el propóleo produce inhibición en el crecimiento bacteriano, y si es así encontrar la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) en la que se produzca el efecto, es necesario basarnos en procedimientos estadísticos que nos ayuden para aceptar o rechazar la hipótesis propuesta. Por lo que nos apoyamos con la prueba de t de Student, que a través del promedio de las absorbancias en un rango de concentraciones de propóleo, y el valor de la absorbancia en un control positivo del crecimiento, así como parámetros estadísticos como la desviación estándar; se puede encontrar si existe una diferencia significativa entre la media de la concentración analizada y la media de referencia (Control +). La fórmula para evaluar la prueba es la siguiente:

$$\frac{X_1 - X_2}{\sqrt{S_1^2 + S_2^2}}$$

La prueba maneja una zona de aceptación y de rechazo que se impone con los grados de libertad, este valor es asignado por el número de datos en la fórmula $g = (n_1 + n_2) - 2$. El parámetro α es el nivel de significación que es la pequeña probabilidad de cometer un error al aceptar o rechazar una hipótesis verdadera. Tiene valores de 0.01, 0.05 y 0.1, tomaremos el valor de 0.05. Hay dos modalidades unilateral y bilateral, para el estudio ocuparemos la última. Se llama bilateral porque la zona de rechazo se divide entre los dos lados o colas de distribución estadística, para involucrar los valores suficientemente pequeños y suficientemente grandes en la prueba; el α se divide en dos, por lo tanto el valor de nivel de significación es de 0.025.

Teniendo estos datos se evalúa la prueba en cada concentración, el resultado se compara con el obtenido en tablas con los grados de libertad y el nivel de significación, se da una conclusión para aceptar o rechazar la hipótesis planteada.

9.0. BIBLIOGRAFIA

Ávila TS. (1984). Producción intensiva de ganado lechero. Anatomía y fisiología de la glándula mamaria. Edit. Continental. México. pp 139-157.

Báez GJJ. (2002). Estudio epidemiológico de mastitis subclínica bovina en el sector II de Téjaro, Michoacán. (Tesis de licenciatura). Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Facultad de medicina Veterinaria y Zootecnia. Morelia, Michoacán, México. pp 27-28.

Bannerman DD, Paape MJ, Lee J, Zhao X, Hope JC, y Rainard P. (2004). *Escherichia Coli* and *Staphylococcus aureus*. Elicit Differential Innate Immune Responses Following Intramammary Infection. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology*. 11 (3): 463-472.

Bedolla CC.(2004). Métodos de detección de la mastitis bovina. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia-Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. pp 8

Bedolla CC.(2004). Mastitis Bovina. Cuatro Vientos. No 41. Febrero-Marzo. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. pp. 24-26.

Bedolla, CC, Castañeda, VH, Wolter, W. (2007). Methods of detection of the bovine mastitis. *Revista electrónica de Veterinaria*. Vol. VIII, N° 9.

Bedolla, CC, Ponce de León, MER. (2008). Economic causalities inflicted by the bovine mastitis in the milk industry. *Revista electrónica de Veterinaria*. Volumen IX Número 4.

Blowey R, y Edmonson P. (1995). Control de la mastitis en granjas de vacuno de leche. Acribia. Zaragoza. 208 pp.

Carrión GM.(2001). Principios básicos para el control de la mastitis y el mejoramiento de la calidad de leche. Instituto Politécnico Nacional, Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional-Michoacán, Departamento de Recursos Naturales Programa de Apoyo a la Ganadería Regional. pp 28-30.

Cerero Omelio, Castillo Julio César, Salado José. (2005). Subclinical mastitis: detection by different diagnose techniques in bovine heris. *Revista electrónica de Veterinaria* Vol. 6, No. 3.

Charles A. (1984). Ciencia de la leche. Principios de técnica lechera. Edit. CECSA, México. 310 pp.

Djabri B, Barielle N, Beaudeau F, Seegers H. (2002). Quarter milk somatic cell count in infected dairy cows: a meta analysis. *Vet. Res*. 33:335-357.

Eberhart R.J., Harmon V.M.P, (1987) CONCEPTOS ACTUALES DE MASTITIS BOVINA, CONSEJO NACIONAL DE MASTITIS, Nacional Mastitis Council, Derechos reservados Pág. 6,7

Enzo A. Tosi *, Edmundo Re´, Marta E. Ortega, Ampelio F. Cazzoli, (2007) Food preservative based on propolis: Bacteriostatic activity of propolis polyphenols and flavonoids upon *Escherichia coli* Argentina, *Food Chemistry* 104,1025–1029

Erskine RJ. (2001). Mastitis Control in Dairy Herds. In: Radostits OM, editor. *Herd Health Food Animal Production Medicine*. Philadelphia, Penn: WB Saunders Co. pp 397-433.

Faría R.José F., Aleida G. Urdaneta, Gerardo D'Pool, Kutchynskaya V. Leal, María A. Cagnas¹ y Geovany Angelosante. (2005). Detection of Subclinical Mastitis in Dual Purpose Bovines By Hand Milking or Milking Machine. Comparasion of Three Diagnostic Tests. *Revista Científica, FCV-LUZ / Vol. XV, N° 2*, 109-118.

Fernández del Río JA. (1997). Mastitis. Tema V., en: *Calidad y eficiencia en la producción de leche. Manual de procedimientos para la ordeña*. Virbac. Departamento técnico. pp. 13-18.

Hansen PJ, Soto P, y Natzke RP. 2004. Mastitis and Fertility in Cattle-Possible Involvement of Inflammation or Inmune Activation in Embryonic Mortality. *American Journal of Reproductive Immunology*. 51: 294-301.

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.

Hillerton JE, y Berry EA. 2005. A review. Treating Mastitis in The Cow-a Tradition or an Archaism. *Journal of Applied Microbiology*. 98: 1250-1255.

K .Bosio, C. Avanzini, A. Davolio, O. Ozino, D. Savoia (2000) In vitro activity of propolis against Streptococcus pyogenes Letters in Applied Microbiology Volumen 31, Issue 2, pages 174–177, August

Kerr DE, y Wellnitz O. 2003. Mammary Expression of News Genes to Combat Mastitis. *J Anim. Sci.* 81 (suppl.3): 38-47.

Koneman Elmer, Stephen Allen, et al. (2001). *Diagnostico microbiológico: Texto y atlas a color*. 5ª ed. Ed. Médica Panamericana. Madrid España.

Larroa, T.R.M. (1987) *Hacia una tipología de leche en México. Seminario internacional aproximación*.

Li-Chang Lua, Yue-Wen Chenb, Cheng-Chun Choua,T (2005) Antibacterial activity of propolis against *Staphylococcus aureus* *International Journal of Food Microbiology* 102 213– 220

Medina CM, y Montaldo VH. 2003. El uso de la prueba de conductividad eléctrica y su relación con la prueba de California para mastitis. CNM. V Congreso Nacional de Control de Mastitis. Aguascalientes, Ags., México. 29-31 de Mayo.

Metzner J, Bekemeier H, Paintz M, Schedewind E. (1979) On the antimicrobial activity of propolis and propolis constituents. *Pharmazie*; 34:97-102.

Mirzoeva O.K., Grishanin R.N., Calder P.C., ANTIMICROBIAL ACTION OF PROPOLIS AND SOME OF ITS COMPONENTS: THE EFFECTS ON GROWTH, MEMBRANE POTENTIAL AND MOTILITY OF BACTERIA, (1997) *Microbiology Research*, September, 152(3): 239-246.

Morresey PR. (1999). Bovine Mastitis. In: Howard JL, Smith RA, editors. *Current Veterinary Therapy 4 Food Animal Practice*. Philadelphia, Penn: WB Saunders Co, 563-568.

Norberg E, Hogeveen H, Korsgaard IR, Friggens NC, Sloth KHMN, y Løvendahl P. (2004). Electrical Conductivity of Milk: Ability to Predict Mastitis Status. *J. Dairy Sci.* 87:1099–1107.

Orsi, R. O.; Sforcin J. M., Rall V. L. M., Funari S. R. C., Barbosa L., Fernandes JR A. (2005). «Susceptibility profile of Salmonella against the antibacterial activity of propolis produced in two regions of Brazil». *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* 11 (2): pp. 109–116

Perez DM. (1986). Manual sobre ganado productor de leche. Edit. Villicaña S.A., México. pp 710-744.

Pérez CG, Bedolla CC, Castañeda VH. (2005). Importancia del conteo de células somáticas en la cría sustentable de vacas productoras de leche. *Sustentabilidad*. Vol III, No 1. Universidad de Guadalajara, Jalisco., México. pp. 86-94.

Philpot WN, y Nickerson SC. (1992). Mastitis: El contra ataque. Publicado por Surge Internacional. Naperville, IL. U.S.A.

Philpot WN. (2001). Importancia de la cuenta de células somáticas y los factores que la afectan. III Congreso Nacional de Control de Mastitis y Calidad de la Leche. Junio de 2001. León, Gto. México. 26 pp.

Radostits O.M, Gay C.C, et al. (2002). *Medicina veterinaria: tratado de enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino*. 9ª ed. Ed. Mc Graw Hill. Madrid España.

Radostits OM, Gay CC, Blood DC, Hinchcliff KW. (2002). *Medicina Veterinaria. Mastitis Bovina*. Edit. Mcgraw-hill. 9o Edición. Vol 1. Madrid, España. pp 728, 810.

Rajala P. J, Smith K. L, Hogan J. S, Love B. C. (2004). Antimicrobial susceptibility of mastitis pathogens from first lactation and older cows. *Veterinary microbiology* 102, 33-42.

Roger Blowey, Weaver David. (2003). *Atlas a color de enfermedades y trastornos del ganado vacuno*. 2ª ed. Ed. Elsevier. Madrid España.

Sánchez, A. Contreras, J.C. Corrales, P. Muñoz. (2004). Influence of sampling time on bacteriological diagnosis of goat intramammary infection. *Veterinary Microbiology* 98, 329–332.

Saron Arthur, Marcelo Chaffer. (2000). MASTITIS Y CALIDAD DE LA LECHE. Ed. Intermedica. Buenos Aires Argentina 194pp

Sauri G, (1996). CAYO 13.1% LA PRODUCCIÓN DE LECHE DURANTE 1995. Análisis económico el financiero, México D.F, 16 de febrero

Scazzocchio F, D' Auria FD, Alessandrini D, Pantanella F. (2006) Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. Microbiology Research; 101: 327-333.

Schalm O.W., Carroll J.E., (1971). BOVINE MASTITIS. Philadelphia: Lea and Febiger.

Wiesner E., William C., Rebhun, Guard Chuck, (1991). ENFERMEDADES DEL GANADO VACUNO, editorial ACRIBIA, S.A, Zaragoza- España, Pág. 332-344, 345-346.

Wolfgang Joklik, Willet Hilda, et al. (1998). Zinsser Microbiología. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires Argentina.

Wolter W., Castañeda V.H., Kloppert B., y Zschoeck M. (2000). La mastitis bovina. Instituto Estatal de Investigaciones de Hesse. Universidad de Guadalajara.

Wolter W, Castañeda H, Kloppert B, y Zschöck M. (2004). Mastitis bovina. Prevención, diagnóstico y tratamiento. Editorial Universitaria. Universidad de Guadalajara. 146 pp. Sitio Argentino de Producción Animal