



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

“ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y PERFIL QUÍMICO
DE PROPÓLEOS MEXICANOS SOBRE CEPAS DE
Pasteurella multocida AISLADAS DE CONEJOS”.

T E S I S
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS
P R E S E N T A :
ELISA GUTIÉRREZ HERNÁNDEZ

TUTOR:

DR. TONATIUH A. CRUZ SÁNCHEZ

COMITÉ TUTOR:

DR. JOSÉ GUILLERMO PENIERES CARRILLO

DR. ALFREDO SAHAGÚN RUÍZ



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.

Este trabajo fue apoyado por los siguientes proyectos:

Proyecto PAPIIT: IT223811-3 “Perspectivas del uso del propóleos en la salud animal”.

Proyecto PAPIIT: IN211008-3 “Evaluación de la actividad antimicótica de compuestos sintéticos y naturales sobre la estructura de las células micóticas”.

Proyecto PACIVE GVC11.

El trabajo se realizó en los siguientes laboratorios:

Laboratorio número 6 de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán campo 4, UNAM. Bajo la responsabilidad del Dr. Tonatiuh A. Cruz Sánchez

Laboratorio 121 del edificio de Química Orgánica de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán campo 1, UNAM. Bajo la responsabilidad del Dr. José Guillermo Penieres Carrillo

Laboratorio de Farmacognosia de la Unidad de Biotecnología y Prototipos de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. A cargo de la Dra. María Margarita Canales Martínez.

Parte de los resultados de este trabajo se presentaron en los siguientes eventos:

1. El XXIV Seminario Americano de Apicultura en Cuernavaca-Morelos el 28 de julio de 2010.
2. El VIII Encuentro Nacional de Cunicultura en Pachuca-Hidalgo el 21 de octubre de 2010.

Con el nombre de: Efecto de extractos de propóleos mexicanos de *Apis mellifera* sobre el crecimiento *in vitro* de cepas de *Pasteurella multocida* aisladas de casos clínicos de conejos (*Oryctolagus cuniculus*) con problemas respiratorios.

Esto gracias a los apoyos económicos otorgados por: el Proyecto PAPIIT: IN211008-3 y al Comité Académico del programa de Posgrado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal, respectivamente.

AGRADECIMIENTOS

DIOS

GRACIAS por ayudarme a alcanzar este sueño, nada de esto sería posible sin ti en mi vida, gracias por permitirme concluir esta etapa. Te amo. Gloria y Honra a ti.

Dr. Tonatiuh

Por toda su confianza, su apoyo, sus enseñanzas, por siempre hacerme dar lo mejor y muchas gracias por apoyar mi interés en los conejos.

Dr. Penieres

Por contagiarme su pasión por la química, por toda su paciencia y apoyo, sin su ayuda simplemente no se hubiera logrado terminar muchas gracias.

Dr. Sahagún

Por todas las sugerencias y correcciones en la realización de éste trabajo.

Dra. Amparo Londoño

Muchas gracias por su ayuda, paciencia y enseñanzas.

Dra. Margarita Canales

Gracias por todo su apoyo, que fue crucial para realizar este trabajo, gracias.

A los miembros del jurado

Dr. René Miranda Rubalcaba, Dr. Francisco Aguilar Romo, Dra. Susana Mendoza Elvira, Dra. Laura Jaramillo Meza gracias por invertir su tiempo en revisar este trabajo y de esta manera enriquecerlo.

Marco Mendoza

Por todo el apoyo en el aislamiento e identificación de las bacterias por toda tu paciencia y tus enseñanzas.

Chelo

Gracias por todas enseñanzas y apoyo.

Mamá

Mil gracias por todo tu apoyo, tu comprensión y tu amor incondicional, te amo muchísimo mami.

Papá

Por todo tu apoyo, por todos tus consejos y ayuda, te amo.

Aydee

Por todo tu apoyo, impulso, amor, gracias por levantarme en cada momento que lo necesite. Esto es tanto tuyo como mío, te amo.

Elena

Por tu apoyo y colaboración. Bichito eres la mejor te amo muchísimo.

Lili

Muchas gracias tú fuiste la personita que me dio el último empujón, te quiero.

Ari, Laura, Bety

Muchas gracias por su ayuda y por siempre hacerme reír y relajarme en los momentos más estresantes, gracias.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	xi
GLOSARIO DE TÉRMINOS	xii
RESUMEN	xiii
ABSTRACT	xiv
I. INTRODUCCIÓN	1
Antecedentes del propóleo.	1
Composición del propóleo.	2
Mecanismos de acción antimicrobiana del propóleo.	4
Propóleos mexicanos.	5
Propóleo en Medicina Veterinaria.	7
<i>Pasteurella multocida.</i>	8
Características generales	8
Taxonomía y características de género	8
Problemas respiratorios en conejos.	11
Técnicas de separación y análisis químico.	13
Cromatografía.....	13
Cromatografía de Gases.	14
Espectrometría de masas.	15
II. JUSTIFICACIÓN	18
III. OBJETIVOS	19
Objetivos Generales.	19
Objetivos Particulares.	19
IV. HIPÓTESIS	20
V. MATERIAL Y METODOS	21
Propóleos	22
Procedencia de los propóleos	22
Preparación del extracto etanólico de propóleo (EEP).....	27

Aislamientos Bacterianos.....	27
Granjas cunícolas visitadas.	28
Procesamiento de muestras.	29
Muestras <i>in vivo</i>	29
Muestras de tejido pulmonar y tráquea de animales muertos por pasteurelisis.	29
Pruebas de sensibilidad.....	30
Preparación de los inóculos.	30
Preparación del "Stock" de propóleo.	30
Inoculación.	32
Cromatografía de gases y espectrometría de Masas.	32
VI. RESULTADOS.....	34
Cepas bacterianas.....	34
Rendimiento de los propóleos.....	34
Prueba de sensibilidad.	35
Análisis estadístico.....	38
Análisis de los propóleos.	44
VII. DISCUSIÓN	61
VII. CONCLUSIONES.....	66
VIII. PERSPECTIVAS	68
IX. ANEXOS	69
Anexo 1 Preparación de Frotis.....	69
Anexo 2 Tinción de Gram.....	69
Anexo 3 Prueba de Catalasa.....	70
Anexo 4 Prueba de Motilidad.....	70
Anexo 5 Prueba de Hialuronidasa	71
Anexo 6 Prueba de Floculación con acriflavina	71
Anexo 7 Otras pruebas que nos ayudan a la identificación de <i>Pasteurella multocida</i>	72
X. LITERATURA CITADA	73

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Principales componentes químicos del propóleo. (Rojas, 2008)	3
Tabla 2 Especies pertenecientes al género <i>Pasteurella</i> (García, 2010)	9
Tabla 3 Subespecies de <i>P. multocida</i> (García, 2010).....	9
Tabla 4 Resumen de los tipos de cromatografía (Day, 1989).....	14
Tabla 5 Cantidad colectada de los propóleos en bruto expresada en gramos.	26
Tabla 6 Muestra el rendimiento de los 5 propóleos al pasar de propóleo bruto a extracto etanólico de propóleo.	34
Tabla 7 Muestra el rendimiento en peso seco de los EEP durante su proceso en que fueron llevados a sequedad, así como los gramos que se obtuvieron en cada uno de estos procesos.....	35
Tabla 8 Resultados de la prueba de sensibilidad <i>in vitro</i> de <i>P. multocida</i> frente a los 5 EEP, provenientes de los diferentes municipios de la República Mexicana.....	36
Tabla 9 Resultados de la prueba de sensibilidad <i>in vitro</i> de <i>Pasteurella multocida</i> frente a 5 EEP provenientes de diferentes municipios de la República, a tres diferentes concentraciones (0.3 mg/ml, 0.6 mg/ml y 0.9 mg/ml).....	37
Tabla 10 Comparación de los tiempos de retención (TR) y porcentaje de abundancia obtenidos en la espectrometría de masas de los 5 propóleos.	45
Tabla 11 Tiempos de retención, porcentajes y la propuesta del compuesto de acuerdo a la base de datos del equipo de espectrometría de masas y la aplicación de criterio químico del propóleo del municipio de Albino Zertuche-Puebla.	46
Tabla 12 Tiempos de retención, porcentajes y la propuesta del compuesto de acuerdo a la base de datos del equipo de espectrometría de masas y la aplicación de criterio químico del propóleo de Tlacotalpan-Veracruz.....	47
Tabla 13 Tiempos de retención, porcentajes y la propuesta de los compuestos dados por la base de datos del equipo de espectrometría de masas y la aplicación de criterio químico del propóleo de FESC-Estado de México.	48
Tabla 14 Tiempos de retención, porcentajes y la propuesta del compuesto de acuerdo a la base de datos del equipo de espectrometría de masas y la aplicación de criterio químico del propóleo de San Juan del Río-Querétaro.	49

Tabla 15 Tiempos de retención, porcentajes y la propuesta del compuesto de acuerdo a la base de datos del equipo de espectrometría de masas y la aplicación de criterio químico del propóleo de Valle de Santiago-Guanajuato.....	50
Tabla 16 Porcentaje de flavonoides totales en los 5 propóleos estudiados.....	53
Tabla 17 Pruebas que ayudan a la identificación bacteriológica y los resultados esperados para <i>Pasteurella multocida</i> (Cowan, 1979).....	72

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Esquema de un espectrómetro de masas de ionización con electrones y sector magnético (McMurry, 2001).....	15
Figura 2 Se muestra un ejemplo de grafico de un espectro de masas que en este caso corresponde al espectro de masas de la naringenina.	17
Figura 3 Diseño experimental dividió en dos etapas.	21
Figura 4 Propóleo en bruto del municipio de Albino Zertuche en el Estado de Puebla. .	22
Figura 5 Propóleo del municipio de Tlacotalpan en el Estado Veracruz.....	23
Figura 6 Propóleo de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán en Cuautitlán Izcalli, Estado de México.....	24
Figura 7 Propóleo del municipio de San Juan del Río en el Estado de Querétaro.....	24
Figura 8 Propóleo del municipio de Valle de Santiago en el Estado de Guanajuato.....	25
Figura 9 Mapa de la República Mexicana donde se muestran con el número 1 al Estado de Guanajuato, el 2 nos indica Querétaro, el 3 al Estado de México, el 4 Puebla y el 5 al Estado de Veracruz de los cuales proceden los propóleos estudiados.	26
Figura 10 El esquema muestra como fue realizado el stock de propóleo que se utilizo en las pruebas de sensibilidad.....	31
Figura 11 Comparación de los porcentajes de cepas de <i>Pasteurella multocida</i> inhibidas por los propóleos de 1 Albino Zertuche, 2 Tlacotalpan, 3 FESC, 4 San Juan del Rio y 5 Valle de Santiago. Diferencia estadísticamente significativa entre los propóleos estudiados, *** (p<0.001), * (p<0.05).....	39

Figura 12 Arriba se muestra el control (Agar Mueller-Hinton), abajo se muestran 3 diferentes concentraciones [5%, 10% y 15%] de etanol al 70%, todas con crecimiento normal.	40
Figura 13 Arriba se muestra el control (Agar Mueller-Hinton) con crecimiento normal, abajo se muestran 3 diferentes concentraciones [0.3 mg/ml, 0.6 mg/ml y 0.9 mg/ml] del extracto etanólico de propóleo proveniente de Albino Zertuche.	41
Figura 14 Arriba se muestra el control (Agar Mueller-Hinton) con crecimiento normal, abajo se muestran 3 diferentes concentraciones [0.3 mg/ml, 0.6 mg/ml y 0.9 mg/ml] del extracto etanólico de propóleo proveniente de Tlacotalpan.....	41
Figura 15 Arriba se muestra el control (Agar Mueller-Hinton) con crecimiento normal, abajo se muestran 3 diferentes concentraciones [0.3 mg/ml, 0.6 mg/ml y 0.9 mg/ml] del extracto etanólico de propóleo proveniente la FES-Cuautitlán.....	42
Figura 16 Arriba se muestra el control (Agar Mueller-Hinton) con crecimiento normal, abajo se muestran 3 diferentes concentraciones [0.3mg/ml, 0.6mg/ml y 0.9mg/ml] del extracto etanólico de propóleo de San Juan del Rio.	42
Figura 17 Arriba se muestra el control (Agar Mueller-Hinton) con crecimiento normal, abajo se muestran 3 concentraciones diferentes [0.3 mg/ml, 0.6 mg/ml y 0.9 mg/ml] del extracto etanólico de propóleo del municipio de Valle de Santiago con una inhibición total en las 3 concentraciones.....	43
Figura 18 Limoneno.....	51
Figura 19 2,3-Dihidro-5,7-dihidroxi-flavona.....	52
Figura 20 Cromatograma de gases del propóleo del municipio de Albino Zertuche, donde se muestran los nombres de los compuestos más abundantes.....	56
Figura 21 Cromatograma de gases del propóleo del municipio de Tlacotalpan, donde se muestran los nombres de los compuestos más abundantes.....	57
Figura 22 Cromatograma de gases del propóleo de la FES-C, donde se muestran los nombres de los compuestos más abundantes.	58
Figura 23 Cromatograma de gases del propóleo del municipio de San Juan del Rio, donde se muestran los nombres de los compuestos más abundantes.....	59
Figura 24 Cromatograma de gases del propóleo proveniente del municipio de Valle de Santiago, donde se muestran los nombres de los compuestos más abundantes.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS

Ácido desoxirribonucleico	ADN
Carga	z
Centímetro	cm
<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>	CLSI
Código postal	C.P.
Colonia	Col
Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas	CG-EM
Dirección	Dir
Electrón voltios	eV
Extracto etanólico de propóleo	EEP
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán	FESC
Grados celsius	°C
Gramo	g
Kilogramo	kg
Kilometro	km
Masa	m
Masa sobre carga	m/z
Metros sobre el nivel del mar	msnm
Microgramo	µg
Microlitro	µL
Micrómetro	µm
Miligramo	mg
Mililitro	ml
Milímetro	mm
<i>Minimum inhibitory concentration</i>	MIC
Minuto	min
Nanómetro	nm
Tiempo de retención	TR
Unidades formadoras de colonia	UFC

GLOSARIO DE TÉRMINOS

Cromatografía: método de separación de los constituyentes de una mezcla fundado en su adsorción selectiva por sólidos pulverulentos o en su partición entre dos disolventes.

Cromatograma: Imagen obtenida por cromatografía.

Pecoreadoras: se llaman así a las abejas obreras que desarrollan una conducta de forrajeo o forrajeadoras.

Propolización: Es un acto que realizan las abejas de forma totalmente natural acarreado para ello resinas de los árboles del entorno o recuperándolo de viejas colmenas cuando lo encuentran reblandecido por el calor del verano.

Floculación: transformación reversible de un sistema coloidal bajo la acción de un factor exterior, con la formación de pequeños copos.

Propolizadoras: abejas pecoreadoras que trabajan con propóleo.

Propolizar: relleno de los espacios entre los cuadros y rendijas menores, así también para embalsamar pequeños animales que no logran sacar de la colmena.

RESUMEN

El propóleo es una resina cerosa, de composición compleja y consistencia viscosa, que las abejas elaboran a partir de partículas resinosas de diferentes vegetales y que utilizan en la construcción, reparación y protección de la colmena. Sus propiedades medicinales son conocidas desde épocas antiguas y se le ha empleado en tratamientos de enfermedades hasta el día de hoy; ya que poseen actividades como: antibacteriano, antifúngico, antiviral, antiparasitario, anticancerígeno, antiinflamatorio, antioxidante, hepatoprotector e incluso citostático. Su composición y actividad biológica varía dependiendo su origen geográfico, la vegetación o incluso la técnica de recolección.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad antibacteriana “*in vitro*” de cinco extractos etanólicos de propóleo, provenientes de cinco diferentes municipios de la República Mexicana (Cuautitlán Izcalli en el Estado de México, Valle de Santiago en el Estado de Guanajuato, San Juan del Río en Querétaro, Albino Zertuche en de Puebla y Tlacotalpan en el Estado de Veracruz), sobre el crecimiento de cepas de *Pasteurella multocida*, aisladas de conejos con problemas respiratorios, mediante la prueba de dilución en agar. Además, se determinó del perfil químico de estos propóleos por medio de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

De la prueba de sensibilidad, se obtuvo que los diferentes extractos etanólicos de propóleo (EEP) analizados, tuvieron actividad sobre *Pasteurella multocida*; no obstante el propóleo de San Juan del Río el que tuvo la mejor concentración mínima inhibitoria (MIC) de ≥ 0.3 mg/ml.

En cuanto el perfil químico existió gran diferencia en el contenido de compuestos, detectados por cromatografía de gases, se contabilizaron 33 compuestos para el propóleo de Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, 42 en el de Albino Zertuche, 48 en el de Valle de Santiago, 42 en el de San Juan del Río y 16 en el de Tlacotalpan.

Palabras clave: Propóleo, *Pasteurella multocida*, flavonoides.

ABSTRACT

Propolis is a waxy resin, with a complex composition and viscous consistency, elaborated from different resinous vegetable particles by bees and used in the construction, repair, and protection of their hives. Its healing effects have been known since very old times and it has been used as a treatment of many diseases even today, due to their antibacterial, antifungal, antiviral, antiparasitic, anticancer, anti-inflammatory, antioxidant, hepatoprotective, and even cytostatic features. Depending on the geographical origin, the local flora, and the pick up technique, its composition and biological activity could change.

The objective of this research has been the evaluation of the antibacterial activity “in vitro” from five different propolis’ ethanolic extracts, collected from five different states of the Mexican Republic (Cuautitlan Izcalli in the Estado de Mexico, Valle de Santiago in Guanajuato, San Juan del Rio in Queretaro , Albino Zertuche in Puebla and Tlacotalpan in Veracruz). By the agar dilution test, stocks of *Pasteurella multocida* were grown and isolated from rabbits with respiratory diseases. In addition, chemical profile of that propolis was determined by gas chromatography, coupled to mass spectrometry.

It was found that all of the different ethanolic extracts from propolis analyzed, had activity against *Pasteurella multocida*; even though, the best minimum inhibitory concentration of ≥ 0.3 mg/ml of the propolis from San Juan del Rio.

The gas chromatography test showed the chemical profile of the substance and big differences were found between compound contents. In the propolis sample from Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan 33 components were found, in the Albino Zertuche 42, 48 in the one from Valle de Santiago, 42 in the propolis from San Juan del Rio and 16 in the sample from Tlacotalpan.

KEY WORDS: Propolis, *Pasteurella multocida*, flavonoids.

I. INTRODUCCIÓN

Antecedentes del propóleo.

El vocablo propóleo proviene del griego pro: en pro, en provecho y pólis: ciudad, comunidad, y se refiere al uso que las abejas le dan para cerrar parcialmente las vías de acceso a su comunidad o ciudad (Root, 1990).

El propóleo es una resina cerosa, de composición compleja y consistencia viscosa, que las abejas elaboran a partir de partículas resinosas de diferentes vegetales y que utilizan en la construcción, reparación y protección de la colmena (Farré *et al.*, 2004). Es también el responsable de la sanidad de los panales en especial contra microorganismos (Fernández *et al.*, 2005).

Su recolección responde a un patrón de forrajeo, donde las abejas pecoreadoras extraen el propóleo de las yemas valiéndose de sus mandíbulas y de un primer par de patas, durante este proceso la secreción del ácido 10-hidroxidecenoico por las glándulas mandibulares permite el ablandamiento y trituración del propóleo para facilitar su transporte en los cestillos de polen de las patas traseras (Bedascarrasbure, 2010). Al ingresar a la colmena, se dirigen inmediatamente al lugar donde éste es requerido y permanecen quietas, dejando que las abejas propolizadoras, tomen algunas partículas de la sustancia, para comprimirla, agregarle cera y proceder al propolizado (Root, 1990).

Las abejas lo utilizan para consolidar la estructura del panal, y recubrir cuerpos de agentes enemigos (escarabajos, roedores, lagartijas) que al introducirse al interior de la colmena son atacados y muertos; cuyo proceso de necrobiosis afectaría la sanidad de la comunidad apícola y este embalsamamiento impide la descomposición de los cuerpos (Rojas, 2008).

Al propóleo se le considera una de las medicinas más antiguas, la cual es conocida y usada en tratamientos hasta el día de hoy, ya que se le confieren diferentes propiedades como son: antibacteriana, antifúngica, antiviral, antiparasitaria, anticancerígena, antiinflamatoria, (Kulcsár *et al.*, 2008) antitumoral, (Daugusch *et al.*, 2008) anestésica, (Boyanova *et al.*, 2005) antioxidante, (Bankova *et al.*, 2002) hepatoprotector e incluso citostático (Yaghoubi *et al.*, 2007).

Hoy en día el propóleo es un remedio no oficial en los preparados farmacéuticos que no posee lineamientos de calidad y se apoya únicamente en la experiencia. Sus propiedades ya eran conocidas por los egipcios, los griegos y los romanos (Kosalec *et al.*, 2005).

Composición del propóleo.

La composición química de los propóleos es compleja y depende de varios factores como son: la región geográfica, el clima, el relieve, la vegetación natural, las cuencas hidrográficas y otros. La vegetación que rodea a la colmena es de importante consideración ya que es a la que recurren las abejas. Es por esto que los propóleos de diferentes zonas geográficas poseen efectos similares pero difieren en su composición (Imhof *et al.*, 2005).

En cuanto a la técnica de recolección dependerá propiamente de los conocimientos del mismo apicultor al manejar el propóleo.

En lo referente a los componentes químicos, algunos propóleos son tan complejos que pueden contener más de 160 compuestos activos, de los cuales 50% son fenólicos y a éstos se les atribuyen diversas acciones farmacológicas. (Rojas, 2008).

Algunos de los componentes más significativos en este producto apícola son los que se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1 Principales componentes químicos del propóleo. (Rojas, 2008)

Componentes	Ejemplos
Ácidos orgánicos	Como el ácido benzóico, C_6H_5-COOH gálico. $C_7H_6O_5$
Ácidos fenólicos	Ácidos cafeico $C_9H_8O_4$, cinámico $C_{11}H_{13}NO_2S_2$, pumarínico, insofenílico y fenílico.
Aldehídos aromáticos	Vainillina $C_8H_8O_3$, isovainillina $C_8H_8O_3$.
Cumarinas	Esculetol $C_9H_6O_4$, escopuletol.
Flavonoides	Pinocembrina $C_{15}H_{12}O_4$, galangin $C_{15}H_{10}O_5$, pinobanksina $C_{15}H_{12}O_5$
Flavonas	Acacetina $C_{16}H_{12}O_5$, cresina amarilla, pectolinaringenina $C_{17}H_{14}O_6$, tectocrisina $C_{16}H_{12}O_4$.
Flavonoles	Izalqinina, kaempférido $C_{16}H_{12}O_6$, quercetina $C_{15}H_{10}O_7$, remnocitrina.
Flavononas	Pinostrobina $C_{16}H_{14}O_4$, sakuranetina $C_{16}H_{14}O_5$.
Flavononoles	Pinobanksina, ferúlico, los sesquiterpenos y las flavononas (principalmente las galangina $C_{15}H_{10}O_5$)
Minerales	Aluminio, plata, bario, boro, cromo, cobalto, cobre, estaño, hierro magnesio, manganeso, molibdeno, níquel, plomo, silicio, estroncio, titanio, vanadio, zinc.
Vitaminas	Provitamina A y vitamina B3

Las propiedades terapéuticas del propóleo dependen de la calidad de este, así como de las proporciones de los elementos que la constituyen, los cuales se relacionan directamente con su origen geográfico (Hegazi *et al.*, 2002).

Se ha reportado que el propóleo tiene efecto sobre los siguientes agentes infecciosos: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomona aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans* (Bedascarrasbure *et al.*, 2006) *Pasteurella multocida* (Conceição *et al.*, 2004), *Escherichia coli* (Katircioglu *et al.*, 2006), *Helicobacter pylori* (Boyanova *et al.*, 2005).

Mecanismos de acción antimicrobiana del propóleo.

Se ha demostrado que la actividad antimicrobiana del propóleo se da gracias al sinergismo de sus componentes y no de un solo componente (De Vecchi *et al.*, 2007). Los flavonoides y los compuestos fenólicos se consideran como los principales componentes bioactivos de los propóleos (Kosalec *et al.*, 2005). Los flavonoides: pinocembrina, galangina y pinobanksina se les atribuye la mayor actividad bacteriostática y bactericida (Castaldo *et al.*, 2002).

- ❖ El ácido cinámico y algunos flavonoides son los responsables de desacoplar la transducción de energía de la membrana plasmática inhibiendo la motilidad bacteriana (Mirzoeva *et al.*, 1997).
- ❖ Se ha determinado que el propóleo desorganiza la membrana citoplasmática, la pared celular y el citoplasma, provocando una bacteriolisis parcial acompañado de inhibición en la síntesis de proteínas (Takaisi *et al.*, 1994).
- ❖ La galangina provoca un incremento considerable en la pérdida de potasio lo cual se atribuye al daño causado directamente en la membrana citoplasmática o bien, podría llevarse a cabo un daño indirecto por un debilitamiento de la pared celular y una lisis como consecuencia de un choque osmótico (Cushnie *et al.*, 2005).
- ❖ La quercetina al menos de manera parcial inhibe la ADN girasa (De Vecchi *et al.*, 2007).

Propóleos mexicanos.

En México la información científica respecto a los propóleos, su actividad biológica y composición química es muy limitada; algunos de los artículos que hemos encontrado relacionados con el tema son:

- ❖ Estudio de la actividad antifúngica de un extracto de propóleo de abeja *Apis mellifera* provenientes del Estado de México. Este trabajo concluye que el extracto etanólico al 15% de propóleo de la abeja *Apis mellifera* procedente del apiario de la Facultad de Estudios Cuautitlán, UNAM, tuvo un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de las levaduras *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans*, y sobre el hongo filamentoso *Aspergillus fumigatus*, el cual fue demostrado a través de dos pruebas de susceptibilidad, y sugiere el posible tratamiento de las enfermedades causadas por estos hongos (Londoño *et al.*, 2008).
- ❖ Efecto de extractos de propóleos mexicanos de *Apis mellifera* sobre el crecimiento *in vitro* de *Candida albicans*. En el cual se estudió la actividad antifúngica de ocho extractos etanólicos de propóleos provenientes de diferentes regiones de México frente a *C. albicans* una cepa de referencia (ATCC 10231) y 36 cepas de origen clínico. Resultando que los propóleos de los municipios de Cuautitlán Izcalli y Amatepec, en el Estado de México fueron los que presentaron mayor actividad biológica (Quintero *et al.*, 2008).
- ❖ Componentes químicos del propóleo rojo Mexicano. En este estudio se obtuvo la composición química del propóleo rojo mexicano recolectado en Yucatán, y se realizó el aislamiento de siete flavanonas, isoflavonas y pterocarpanos y tres nuevos productos naturales que fueron el 1 - (30,40-dihidroxi-20-metoxifenil) -3 - (fenil) propano, el (Z) -1 - (20-metoxi-40, 50 - dihidroxifenil) -2 - (3-fenil) propeno y el 3-hidroxi-5 ,6-dimethoxyflavan. Este reporte es el primero para el arizonicanol A y dimelilotocarpan A y D, por lo que, estos compuestos pueden

ser marcadores taxonómicos para los propóleos rojos Mexicanos. El estudio concluye que los compuestos característicos de los propóleos rojos mexicanos tienen una distribución muy restringida en el reino vegetal y se producen casi exclusivamente en la familia de las leguminosas. Además, el estudio apoya que el origen botánico del propóleo rojizo es el género *Dalbergia* (un gran género de pequeños a medianos árboles, arbustos y lianas de la familia de leguminosas) y que las plantas de este tipo probablemente son las que dan origen al propóleo rojo Mexicano (Lotti *et al.*, 2010).

- ❖ Estudio antibacteriano comparativo entre extracto de propóleo mexicano y tres plantas utilizadas por *Apis mellifera* para su producción. En este estudio se evaluó la actividad antibacteriana de tres diferentes plantas y un extracto etanólico de propóleo contra cepas de *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella tiphy*, *Yersenia, enterocolitica*, *Enterobacter aerogene*, *Enterobacter agglomerans*, *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*. Además realizó estudios cromatográficos del propóleo (Londoño *et al.*, 2010).

A diferencia de países como Argentina, Brasil, Honduras, China y Turquía entre muchos otros, en México no se han estudiado a profundidad el origen botánico o químico de nuestros propóleos (Quintero *et al.*, 2008).

Un estudio realizado en el 2004 titulado: Efecto “*in vitro*” del extracto alcohólico de propóleo sobre *Pasteurella multocida* en conejos. Se observó actividad antimicrobiana, *in vitro*, así mismo; se demostró actividad *in vivo* sobre esta bacteria en los conejos cuando les fue administrado propóleo en las raciones de alimento, obteniendo una reducción en el número de unidades formadoras de colonias de *P. multocida* a nivel traqueobronquial de estos animales (Conceição *et al.*, 2004).

Propóleo en Medicina Veterinaria.

Los usos del propóleo en la medicina veterinaria son variados y se ha empleado como suplemento en la dieta de pollos de engorda obteniendo beneficios en su rendimiento con la adición de 250 mg/kg (Khojasteh, *et al.*, 2006). Además se ha visto que en gallinas de postura suplementar 100 o 150 mg/kg de propóleo en la dieta beneficia el rendimiento, la inmunidad y permite explotar todo el potencial genético de las gallinas (Galal *et al.*, 2008). En perros y gatos se ha empleado en el tratamiento de oftalmopatías, donde un 90% de los animales tratados con la suspensión oftálmica de propóleo respondieron positivamente en tan solo un tratamiento de 5 a 7 días; mientras que los animales que cursaban con cuadros crónicos requirieron un tratamiento de entre 10 y 15 días para mejorar ostensiblemente (Giral *et al.*, 2007). Se han utilizado preparados a base de propóleo en el tratamiento de otitis en perros donde el 71% de los perros tratados respondieron satisfactoriamente tras un tratamiento de 14 días (Lozina *et al.*, 2010). También se han empleado preparados a base de propóleo para el tratamiento de mastitis en vacas (Botanical-online). Öztürk *et al.*, en el 2010 señaló que el propóleo puede ser un aditivo útil para disminuir la producción de amoníaco ruminal y mejorar la utilización de nitrógeno en los rumiantes. En cuba se emplea el propóleo en conejos para el tratamiento de la coccidiosis, además de que se ha probado su efecto en tratar parasitosis intestinales tanto en animales como en el hombre; en becerros se utiliza soluciones oftálmicas para tratar problemas de ojo rosado (González, 2010).

Pasteurella multocida.

Características generales

Pasteurella multocida la especie microbiológica más frecuentemente aislada y la que provoca los procesos respiratorios más graves en conejos. Se trata de cocobacilos pleomórficos Gram negativos con una típica tinción bipolar, los que pueden aparecer sueltos o agrupados en parejas o bien en cadenas cortas. *P. multocida* es un anaerobio facultativo, inmóvil, crece bien en medios de agar sangre, chocolate y Mueller-Hinton, pero no en agar McConkey, eosina azul de metileno (EMB), ni en otros medios selectivos o diferenciales empleados para el aislamiento de enterobacterias. Además, las reacciones bioquímicas que se consideran constantes y características son: metabolismo fermentativo, reacción positiva para el indol, negativa para la ureasa y producción de ácido a partir de hexosas (Koneman *et al.*, 1999).

Taxonomía y características de género

Pasteurella multocida es una especie bacteriana miembro de la familia *Pasteurellaceae* la cual es muy heterogénea, que se ha sometido a múltiples reclasificaciones. Actualmente comprende 15 géneros según la Lista de Nombres Procariontes con pie en la Nomenclatura (LPSN del inglés, List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature): *Actinobacillus*, *Aggregatibacter*, *Avibacterium*, *Basfia*, *Bibersteinia*, *Chelonobacter*, *Gallibacterium*, *Haemophilus*, *Histophilus*, *Lonepinella*, *Mannheimia*, *Nicoletella*, *Pasteurella*, *Phocoenobacter* y *Volucribacter* (LPSN, <http://www.bacterio.cict.fr/> 2011).

La familia *Pasteurellaceae* se distingue de otras familias en varios aspectos entre ellos destaca su tamaño, ya que son pequeños cocobacilos que miden de 0.2 a 0.3 µm de diámetro, inmóviles, capsulados, no esporulados, generalmente oxidasa positivas y son parásitos de los vertebrados (Prescott *et al.*, 2004).

Además se han descrito nuevas especies de *Pasteurella*, la mayoría aisladas en animales que se muestran en la Tabla 2

Tabla 2 Especies pertenecientes al género *Pasteurella* (García, 2010)

Especies y subespecies	Hábitat
<i>Pasteurella aerogenes</i>	Flora normal del tracto intestinal de los cerdos
<i>Pasteurella anatis</i>	Flora intestinal de patos
<i>Pasteurella avium</i>	Flora del tracto respiratorio de aves de corral sanas
<i>Pasteurella bettyae</i>	Glándula de Bartholin humana
<i>Pasteurella caballi</i>	Aislamiento equino causal de neumonía
<i>Pasteurella canis</i>	Tracto respiratorio de perros
<i>Pasteurella dagmatis</i>	Tracto respiratorio de perros y gatos
<i>Pasteurella gallinarum</i>	Tracto respiratorio de pollos y gallinas
<i>Pasteurella granulomatis</i>	Enfermedad granulomatosa progresiva del ganado vacuno
<i>Pasteurella haemolytica</i>	Infecciones neumónicas en ganado vacuno, mastitis en ovejas, septicemia en ganado caprino y ovino
<i>Pasteurella langaaensis</i>	Es un comensal de las aves
<i>Pasteurella lymphangitidis</i>	En una de las causas de linfangitis en el ganado
<i>Pasteurella mairii</i>	Causa abortos en cerdas
<i>Pasteurella multocida</i>	Tracto respiratorio de varios mamíferos
<i>Pasteurella pneumotropica</i>	Tracto respiratorio de cobayos, ratas, hamsters, perros y gatos
<i>Pasteurella skyensis</i>	Causa de mortalidad en el salmón atlántico
<i>Pasteurella stomatis</i>	Comensal en perros y gatos, puede causar bronquitis
<i>Pasteurella testudinis</i>	Parasita en varias especies de tortugas del desierto
<i>Pasteurella ureae</i>	Flora del tracto respiratorio de humanos
<i>Pasteurella volantium</i>	Flora del tracto respiratorio de aves de corral sanas

Existen tres subespecies de *P. multocida* las cuales se distinguen, principalmente, en función de su capacidad para utilizar los azúcares sorbitol y dulcitol que se muestran en la Tabla 3 (García, 2010).

Tabla 3 Subespecies de *P. multocida* (García, 2010).

Subespecies	Sorbitol	Dulcitol
<i>Pasteurella multocida</i> subsp. <i>gallicida</i>	+	-
<i>Pasteurella multocida</i> subsp. <i>multocida</i>	-	-
<i>Pasteurella multocida</i> subsp. <i>septica</i>	+	+

Pasteurella multocida subespecie *multocida* es la más frecuente en todo tipo de hospederos, siendo las subespecies *Pasteurella multocida gallicida* y *Pasteurella multocida septica* mucho menos habituales. La subespecie *multocida* es común en ganado porcino, bovino, aves, gatos, perros y conejos.

De esta bacteria se conocen internacionalmente los tipos capsulares A, B, D y E de acuerdo con la clasificación de Carter (Carter, 1973). Los tipos B y E que producen septicemia hemorrágica en los bovinos y búfalos de agua localizados en África, Asia y algunos países europeos; mientras que los tipos A y D se relacionan con pasteurelosis pulmonar, tal y como ocurre en el continente americano (Boyce *et al.*, 2000). DeAngelis *et al.*, en el año 2000 habla de un quinto tipo capsular, el F. Estas 5 variedades capsulares de *P. multocida* (A, B, D, E y F) se distinguen por su composición. Se sabe que en general la cápsula de *Pasteurella multocida* está compuesta de carbohidratos y, aunque no se conocen con exactitud la composición de cada uno de los cinco tipos capsulares (García, 2010).

Se ha investigado la composición de la cápsula solo de los tipos A, B, D y F y de esta manera se sabe que la cápsula tipo A esta formada en gran parte por ácido hialurónico, y que este es el responsable de dar el aspecto mucoso a las colonias. La cápsula tipo D parece contener heparina, la tipo F condroitin sulfato, la tipo B contiene fructosa, manosa, glucosa (Boyce *et al.*, 2000*).

La cápsula le confiere a la bacteria una importante resistencia a la fagocitosis y la adherencia selectiva que muestran hacia diferentes sustratos (Gutiérrez *et al.*, 1993). Además la cápsula sirve de protección a la bacteria contra el medio ambiente.

Se sabe que tipos capsulares A y D de *P. multocida* tienen la capacidad de adherirse al epitelio respiratorio, resistir la fagocitosis y la muerte intracelular de los neutrófilos, a estos tipos capsulares se les asocia también con la degeneración de los cornetes nasales por la producción de toxinas, en conejos infectados (Velázquez *et al.*, 2004).

Problemas respiratorios en conejos.

La pasteurelosis es una de las enfermedades que causan mayor impacto económico en diferentes especies animales entre ellas a los cerdos en los cuales provoca rinitis atrófica progresiva, la septicemia hemorrágica afecta a los bovinos, en aves el cólera aviar y en los conejos rinitis (Dziva *et al.*, 2008).

En la cunicultura, los problemas digestivos y respiratorios son los principales responsables de la mortalidad en granjas, y es la pasteurelosis crónica nasal causada por *Pasteurella multocida* la que provoca las pérdidas más importantes en conejos sobre todo en etapas de engorda, donde se observan cuadros de tipo agudo, infecciones de vías respiratorias altas y rinitis (Kulcsár *et al.*, 2008). En los animales reproductores se presentan infecciones de tipo crónico asociados a septicemia, bronconeumonía, pleuritis, pericarditis purulenta, problemas reproductivos y hasta abscesos localizados (Velázquez *et al.*, 2004).

Se considera a la pasteurelosis crónica nasal como la responsable de provocar importantes pérdidas en conejas reproductoras (Lozano, 2003). Las infecciones agudas suelen degenerar en septicemia y muerte de los animales en un periodo de 4 a 10 días (Colombo *et al.*, 2004).

Los problemas respiratorios en los conejos son de origen multifactorial, ocasionando un síndrome respiratorio caracterizado por un conjunto de síntomas, originados por un grupo variable de agentes etiológicos, aunado a su vez a factores ambientales predisponentes como son: una deficiente renovación del aire, variaciones en la temperatura, la humedad que favorece la multiplicación y diseminación bacteriana, la extrema sequedad reseca las mucosas y las irrita, el hacinamiento favorece el contagio, la falta de higiene facilita la presencia de gérmenes, un manejo deficiente incrementa el estrés así como disminución de las defensas (Lozano, 2003).

Los principales agentes microbianos identificados e implicados en este síndrome respiratorio son: *Pasteurella multocida*, *Bordetella bronchiséptica*, *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Francisella tularensis*, *Streptococcus spp.*, *Mycoplasma spp.*, *Aspergillus spp.*, *Yersinia spp.*, *Chlamydia spp.*, *Klebsiella spp.*, Virus de la mixomatosis entre otros (Lozano, 2003).

Los más nocivos de estos agentes son *P. multocida* y *S. aureus* por su frecuencia y la gravedad de las lesiones que provocan, así como la mortalidad que causan.

La infección por *Pasteurella multocida* es una enfermedad de fácil contagio por vía aérea entre animales muy cercanos, o también de forma directa por contacto de madres a gazapos, a través de estornudos, mucosidades, al beber agua contaminada e incluso el personal también podría transmitirla de mano en mano.

La principal vía de entrada de este microorganismo en los animales es, la respiratoria; así, algunas cepas de *P. multocida* se adhieren y colonizan los cornetes nasales o logran tener acceso al pulmón produciendo diferentes síntomas y lesiones que varían dependiendo de su localización y la gravedad de la infección (Lozano, 2003).

Técnicas de separación y análisis químico.

Cromatografía.

La cromatografía fue descubierta por el botánico ruso, Mikhail Tswett en 1906, El empleó la técnica para separar varios pigmentos vegetales, tales como clorofilas y xantofilas, vertiendo extracto de hojas verdes en éter de petróleo sobre una columna de carbonato de calcio en polvo en el interior de una probeta. A medida que la solución va filtrándose por la columna, cada componente de la mezcla precipita a diferente velocidad, quedando la columna marcada por bandas horizontales de colores, denominadas cromatogramas. Ya que aparecían como bandas coloreadas en la columna, lo que da el nombre del método (del griego croma: color y grafos: escribir). Cada banda corresponde a un pigmento diferente (Skoog, *et al.*, 2000).

El uso de la cromatografía está ampliamente extendido en el análisis de alimentos, medicinas, sangre, productos petrolíferos y de fisión radiactiva y es una de los métodos más potentes para fraccionar proteínas (Lehninger *et al.*, 2005).

La cromatografía es un método físico de separación, en el cual los componentes que se van a separar se distribuyen entre dos fases; una de estas fases constituye una capa estacionaria, la otra es un fluido que eluye a través de la fase estacionaria (Day, 1989).

En cromatografía, la fase móvil (el disolvente que desciende a través de la columna) es un líquido o un gas. La fase estacionaria (la que se encuentra fija en el interior) es frecuentemente un líquido que recubre el interior de un tubo capilar o la superficie de partículas sólidas empaquetadas dentro de la columna. En cualquier caso, el reparto de solutos entre las fases móvil y estacionaria da lugar a la separación.

En la Tabla 4 se resumen de los diferentes tipos de cromatografía existentes.

Tabla 4 Resumen de los tipos de cromatografía (Day, 1989).

Fase estacionaria	Sólido		Líquido	
	Líquido	Gas	Líquido	Gas
Fase móvil				
Ejemplos	Cromatografía original de Tswett, con soluciones de éter de petróleo y columnas de CaCO ₃ Cromatografía de intercambio Iónico	Cromatografía gas-sólido o CGS	Cromatografía de partición en columnas de sílica gel Cromatografía en papel	Cromatografía gas-líquido o CGL

Las columnas pueden ser empaquetadas o de tubo abierto. Una columna empaquetada se llena con partículas que contienen la fase estacionaria. La columna de tubo abierto es un capilar hueco estrecho con la fase estacionaria cubriendo las paredes interiores (Harris, 2001).

Cromatografía de Gases.

Se hace pasar el analito (compuesto) en forma gaseosa a través de la columna arrastrado por una fase móvil gaseosa, el gas portador.

En la actualidad, la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM), es uno de los métodos más utilizados en el análisis de propóleos, puesto que permite la adquisición de datos del peso molecular e información estructural, junto con la identificación de compuestos (Bankova, 2005). Algunos ejemplos donde se ha empleado esta técnica para caracterizar propóleos tenemos a Park *et al.*, en el 2002 quien logro establecer el origen botánico de tres propóleos brasileños. Bankova *et al.*, también en el 2002 empleo la CG-EM para conocer la composición química de los propóleos europeos y Katircioglu *et al.*, en el 2006 quien empleó esta técnica para conocer la composición de un propóleo turco.

Espectrometría de masas.

La espectrometría de masas es una técnica que permite la medición de iones derivados de moléculas (Fox, 2000).

El espectrómetro de masas mide el tamaño y la abundancia relativa de estos fragmentos y registra la información en forma de un espectro de masas. Este espectro sirve para identificar un compuesto por comparación con una muestra previamente identificada para determinar su peso molecular exacto y, por medio de un análisis de patrón de fragmentación, para establecer su estructura (Fox, 2000).

La mayoría de los instrumentos que se han desarrollado para producir el espectro de masa se compone de cuatro unidades: sistema de entrada; fuente de iones; sistema acelerador electrostático, y colector del ion, amplificador y sistema de lectura (Willard, 1978).

En la Figura 1 se presenta un esquema del espectrómetro de masas más común que es el instrumento de ionización por electrones y sector magnético (McMurry, 2001).

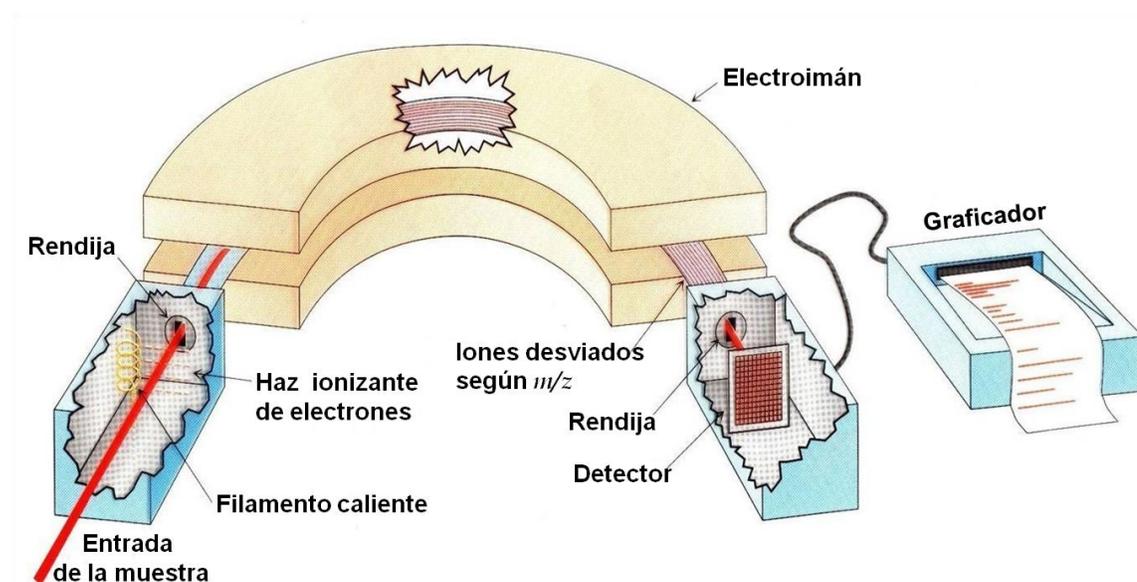


Figura 1 Esquema de un espectrómetro de masas de ionización con electrones y sector magnético (McMurry, 2001).

Las moléculas se ionizan al chocar contra electrones de gran energía y algunas se rompen. El paso de los fragmentos cargados a través de un campo magnético los clasifica de acuerdo con su masa (McMurry, 2001).

Se evapora una pequeña cantidad de muestra, que entra al espectrómetro de masas; allí es bombardeada por un haz de electrones de alta energía. Esta energía puede variar pero lo recomendable es utilizar unos 70 electrón volts (eV). Cuando el electrón de alta energía choca contra una molécula orgánica, expulsa un electrón de valencia de ella y produce un radical catión (catión porque la molécula ha perdido un electrón y adquiere una carga positiva; radical porque la molécula tiene ahora una cantidad impar de electrones).

El bombardeo por electrones transfiere tanta energía a las moléculas, que la mayor parte de los radicales catión se fragmentan después de formarse; éstos salen despedidos en pedazos más pequeños, algunos de los cuales retienen carga positiva y otros son neutros. A continuación los fragmentos pasan a través de un tubo curvo, dentro de un campo magnético intenso, que los desvía en cantidades ligeramente distintas, de acuerdo con su razón de masa a carga (m/z). El campo magnético no desvía los fragmentos neutros y se pierden en las paredes del tubo, pero el espectrómetro clasifica los trozos con carga positiva y pasan a un detector, que los registra en forma de picos en las distintas relaciones de m/z . Dado que z , la cantidad de cargas en cada ion, suele ser 1, el valor de m/z para cada ion es igual a su masa m .

El espectro de masas de un compuesto se acostumbra presentar a manera de una gráfica de barras, (Figura 2) con las masas (valores m/z) en el eje x y la intensidad (cantidad de iones de cierta relación m/z que llega al detector) en el eje de las y y al porcentaje de abundancia relativa. Al pico más alto se llama pico base, se le suele asignar 100% de abundancia relativa (McMurry, 2001).

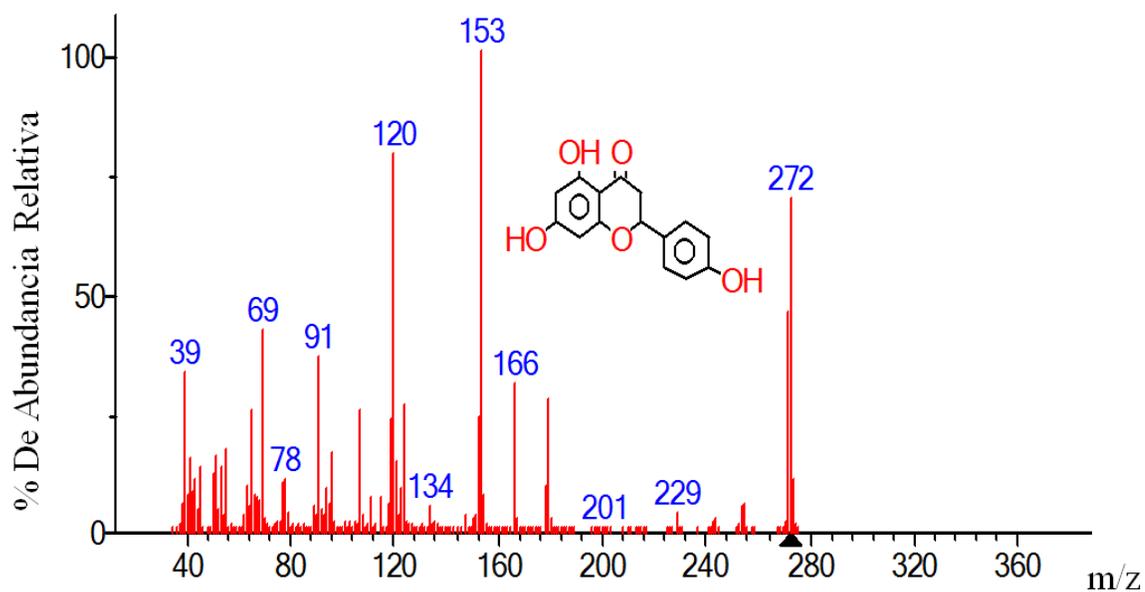


Figura 2 Se muestra un ejemplo de grafico de un espectro de masas que en este caso corresponde al espectro de masas de la naringenina.

II. JUSTIFICACIÓN

Dada la limitada información existente de los propóleos mexicanos acerca de la composición química y su actividad contra microorganismos Gram negativos, y la relevancia que tienen los problemas respiratorios en la producción cunícula causados principalmente por *Pasteurella multocida*, se busca obtener información acerca de estas sustancias en cuanto a su actividad antimicrobiana y perfil químico, para determinar si pueden ser utilizados como una alternativa en el tratamiento de la pasteurelosis en conejos.

III. OBJETIVOS

Objetivos Generales.

- ❖ Evaluar la actividad antibacteriana de propóleos de diferente origen frente aislamientos de *Pasteurella multocida* obtenidos de conejos con problemas respiratorios.
- ❖ Correlacionar la composición química de los propóleos con su actividad antibacteriana.

Objetivos Particulares.

- ❖ Realizar los aislamientos de *Pasteurella multocida* de origen cunícula.
- ❖ Determinar cuál de los diferentes propóleos tiene mayor actividad contra *Pasteurella multocida*.
- ❖ Determinar el perfil químico de cada uno de los propóleos evaluados.

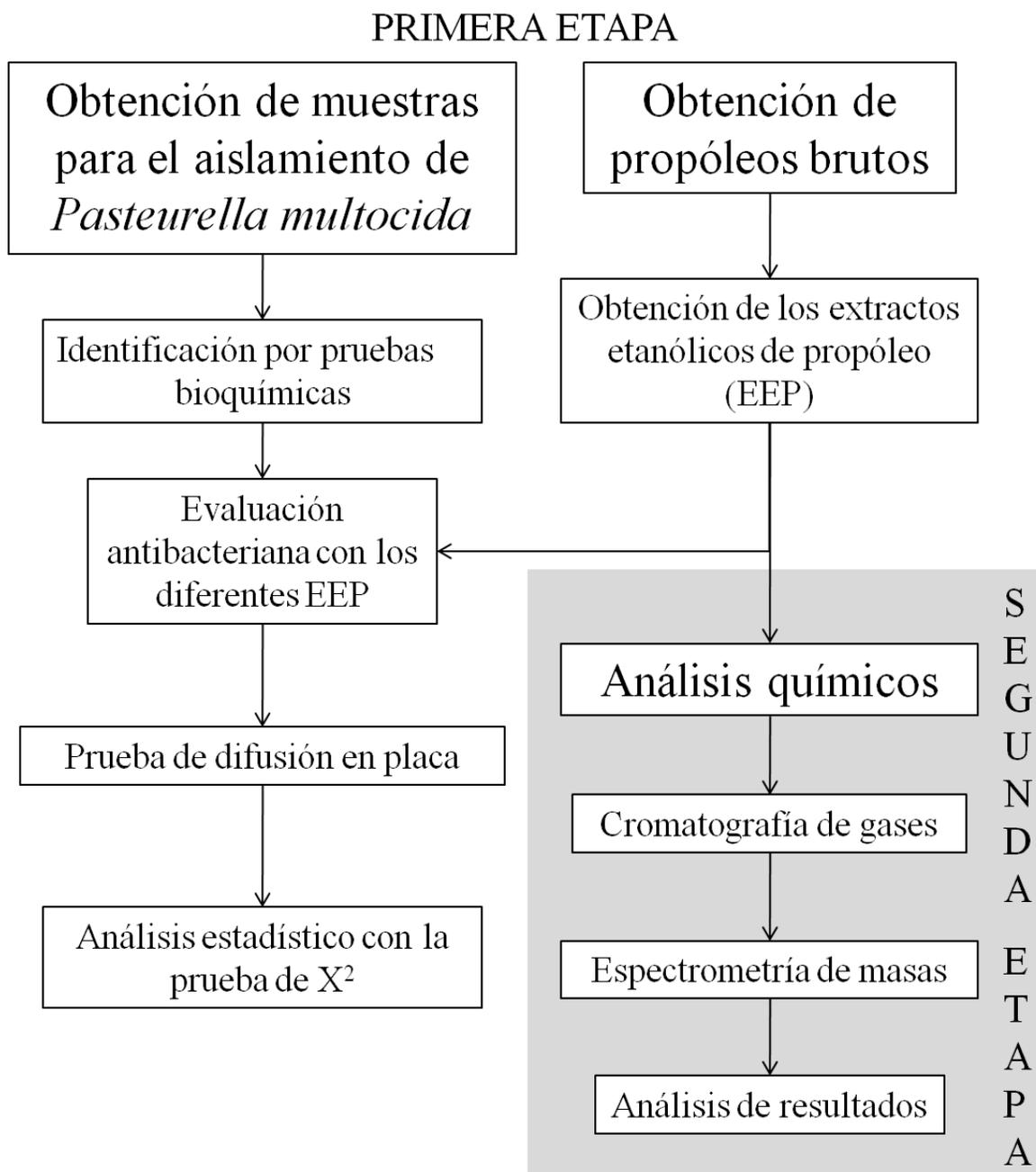
IV. HIPÓTESIS

Los diferentes propóleos mexicanos poseen actividad antibacteriana *in vitro* contra *Pasteurella multocida* y esta actividad depende de los componentes químicos que lo constituyen.

V. MATERIAL Y METODOS

A continuación se muestra de manera grafica el diseño experimental (Figura 3) que se utilizo para el desarrollo del trabajo.

Figura 3 Diseño experimental dividió en dos etapas.



Propóleos

Se buscó coleccionar propóleos brutos o en greña, (es decir, tal como se coleccionan del panal) de diferentes municipios de la República Mexicana con el fin de que todos procedieran de diferentes condiciones geográficas: clima, altitud y vegetación.

Procedencia de los propóleos

Los propóleos se obtuvieron en greña (propóleo bruto) y fueron coleccionados de los apiarios por los propios apicultores.

Se obtuvieron en el siguiente orden:

1. Del municipio de Albino Zertuche perteneciente al Estado de Puebla que se ubica a latitud: 17° 57' 54" y 18° 03' 18" N, longitud: 98° 26' 42" y 98° 34' 00" O, altitud: 1,271 msnm. En este municipio cuenta con flora bosque de encinos amarillos, así como de selva baja caducifolia y algunas medicinales como son quina, paraca, coachalalate y damiana. En la Figura 4 se observa la muestra obtenida de este propóleo.



Figura 4 Propóleo en bruto del municipio de Albino Zertuche en el Estado de Puebla.

2. El propóleo del municipio de Tlacotalpan ubicado a latitud: $18^{\circ} 37' N$, longitud: $95^{\circ} 40' O$, altitud: 10 msnm en el Estado Veracruz. La vegetación que se encuentra en este municipio es de tipo caducifolia y se encuentran árboles como el encino, el fresno, sauce, álamo, naranjo, limón, etc. A continuación se presenta una imagen donde se puede apreciar el aspecto del propóleo en bruto obtenido. (Figura 5)



Figura 5 Propóleo del municipio de Tlacotalpan en el Estado Veracruz

3. El propóleo de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (FES-C) localizada en el municipio de Cuautitlán Izcalli perteneciente al Estado de México y se ubica en el municipio de a latitud: $19^{\circ} 40' 50'' N$, longitud: $99^{\circ} 12' 25'' O$, altitud: 2,260 msnm. El municipio cuenta con ahíles, jacarandas, álamos blancos, colorines, fresnos, eucaliptos, encinos pirules, capulines, sauces, ahuehuetes, etc. En la Figura 6 se presenta una imagen de este propóleo.

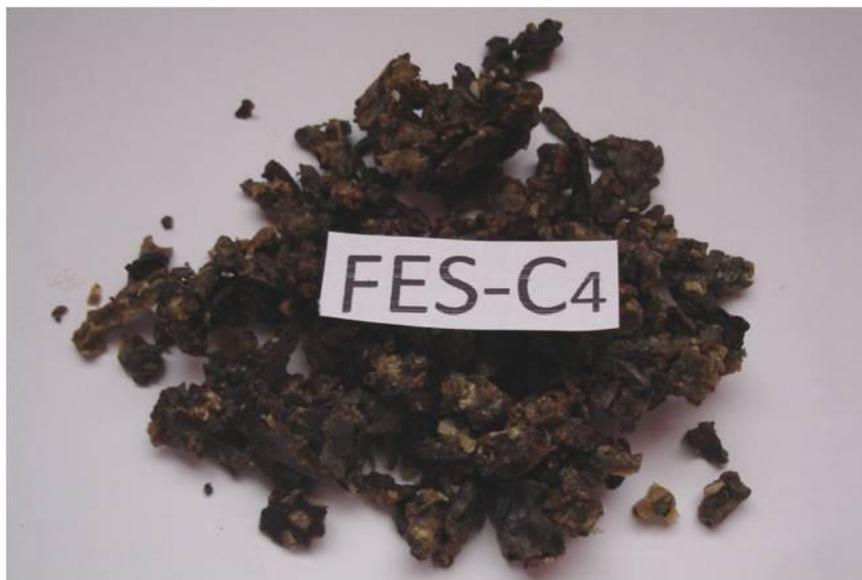


Figura 6 Propóleo de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán en Cuautitlán Izcalli, Estado de México.

4. El propóleo del municipio de San Juan del Río en el Estado de Querétaro ubicado a latitud: 20° 23' 19,83" Norte, longitud: 99° 59' 46,71" Oeste, altura 1,920 msmn. En este municipio cuenta con flora de mezquital, pastizal y matorral. El aspecto de este propóleo se puede observar en la Figura 7.



Figura 7 Propóleo del municipio de San Juan del Río en el Estado de Querétaro.

5. El propóleo del municipio de Valle de Santiago en el Estado de Guanajuato y que se ubica a una latitud $20^{\circ} 23' 31''$, longitud $101^{\circ} 11' 21''$, altura 1,720 msnm. Este municipio cuenta con bosques de encino, mezquite y selva baja caducifolia, además de zacatón, triguillo, lobero, mezquite, banderita nopal, largoncillo, cuijote, tepehuaje, garambullo y casahuate. En la Figura 8 se puede apreciar la muestra obtenida de este propóleo.



Figura 8 Propóleo del municipio de Valle de Santiago en el Estado de Guanajuato.

Los propóleos se colectaron de septiembre de 2009 a marzo de 2010 y antes de ser procesados se conservaron en obscuridad y a temperatura ambiente.

En la Tabla 5 se muestran las cantidades colectadas de cada uno de los propóleos obtenidos.

Tabla 5 Cantidad colectada de los propóleos en bruto expresada en gramos.

Lugar de procedencia		Peso (g)
Albino Zertuche	(Puebla)	404.4
Tlacotalpan	(Veracruz)	242.2
FES Cuautitlán	(Estado de México)	141.2
San Juan del Rio	(Querétaro)	55.8
Valle de Santiago	(Guanajuato)	412.4

En la Figura 9 se presenta un mapa de la República Mexicana donde y se marca a cada uno de los Estados en los cuales se obtuvieron los diferentes propóleos.

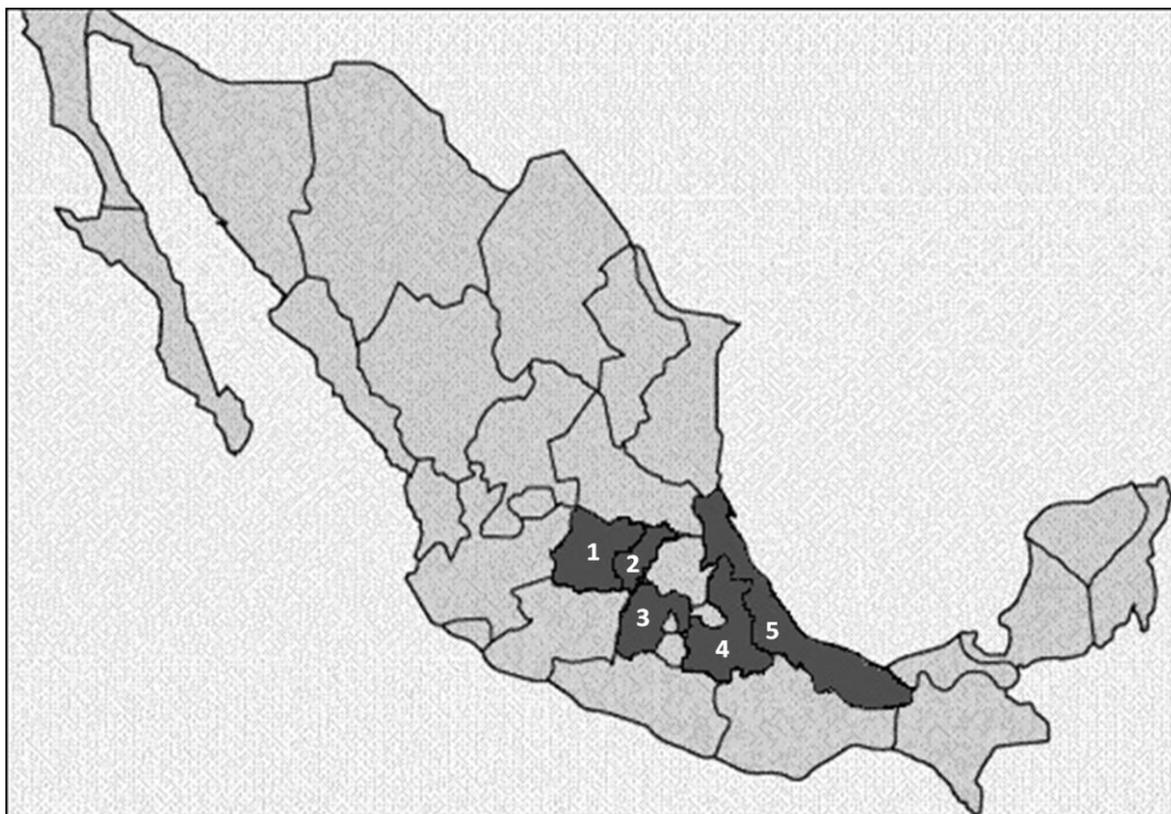


Figura 9 Mapa de la República Mexicana donde se muestran con el número 1 al Estado de Guanajuato, el 2 nos indica Querétaro, el 3 al Estado de México, el 4 Puebla y el 5 al Estado de Veracruz de los cuales proceden los propóleos estudiados.

Preparación del extracto etanólico de propóleo (EEP).

Este procedimiento se realizó en el laboratorio 121 del edificio de Química Orgánica ubicado en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán campo 1, UNAM. Se tomaron 100 g de cada propóleo a excepción del de San Juan del Río del cual solo se usaron 50 g para la extracción. Cada propóleo se limpió, se trituró y se colocó en frascos ámbar con etanol al 70% a razón de 1 a 3 peso/volumen, por 48 hrs. mezclándose esporádicamente.

Después del periodo de 48 hrs se filtró utilizando papel filtro, los sólidos se re suspendieron en la misma proporción de etanol al 70% inicial y se volvieron a filtrar a las 48 hrs. (Este proceso se repitió 2 veces)

A las fracciones filtradas les fue eliminado el exceso de etanol con un Rotovapor Büchi R-205 B-490 con unas constantes de 85 revoluciones de rotación, una temperatura del vapor de 27°C y con una temperatura del baño de 55°C.

Se tomó una alícuota de cada uno de los propóleos para ser llevados a sequedad por evaporación en campana de vacío por un periodo de 12 días, mientras que el resto se evaporó a temperatura ambiente en obscuridad lo cual requirió de 70 días.

Los extractos se mantuvieron en frascos ámbar y en refrigeración a 4°C.

Aislamientos Bacterianos.

Las pruebas de aislamiento, identificación y sensibilidad bacteriana se realizaron en el laboratorio número 6 de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria perteneciente a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán campo 4, UNAM.

Se visitaron 4 diferentes granjas ubicadas en el Estado de México, con el fin de obtener muestras de animales con signología respiratoria (estornudos, mucosidad, dificultad

respiratoria) *in vivo* de cavidad nasal y de animales muertos que mostraron mucosidad en la cavidad nasal o miembros anteriores. Así como de animales sacrificados que presentaban signología respiratoria, en ambos casos se colectaron tráquea y pulmones de donde se aisló la *Pasteurella multocida*.

Granjas cunícolas visitadas.

La primera granja que se visitó fue en el municipio de Tultitlan Estado de México.

- ❖ Se trata de una granja de traspatio.
- ❖ Propietario Sra. Teresa Morales.
- ❖ Dir. Calle Eje 6 Manzana 10 Lote 60, Col. Lomas de Cartagena.
- ❖ En esta granja se nos donaron 2 animales con signos respiratorios.

La segunda granja se ubica en el municipio de Huixquilucan Estado de México.

- ❖ Granja industrial 1500 vientres.
- ❖ Propietario Sr. Oscar Gutiérrez Arsaluz.
- ❖ Dir. Calle Paseo de las rosas s/n Col. Ignacio Allende C.P. 52760.
- ❖ Se nos donaron 5 conejos de la mortalidad del día con evidencia de problemas respiratorios.
- ❖ Y se tomaron muestras nasales de 2 animales vivos con evidentes signos respiratorios.

La tercera granja se ubica en el municipio de Cuautitlán Izcalli.

- ❖ Granja de traspatio con 35 vientres.
- ❖ Propietario Ing. Daniel González S.
- ❖ Dir. Calle Belisario Domínguez No. 100 San Lorenzo Río Tecno.
- ❖ Nos fueron donados 3 conejos con signología respiratoria.

La cuarta granja es la perteneciente a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

- ❖ Granja industrial con 360 vientres.
- ❖ Propietario UNAM.
- ❖ Km 2.5 carretera Cuautitlán – Teoloyucan.
- ❖ Se nos donaron 4 conejos enfermos de vías respiratorias y se tomaron 3 muestras nasales.

Procesamiento de muestras.

Muestras *in vivo*

Se colectaron 5 muestras de la cavidad nasal de conejos con problemas respiratorios mediante hisopos estériles los cuales se colocaron en tubos de ensayo estériles con tapa. Las muestras se sembraron en agar sangre e incubaron a 37°C por un periodo de 24 y hasta 48 hrs, transcurrido este tiempo se procedió a realizar la identificación bacteriológica, identificando aquellas colonias con apariencia grisasea y mucoide.

Muestras de tejido pulmonar y tráquea de animales muertos por pasteurelosis.

Se diseccionaron 14 tractos respiratorios para posteriormente trabajar en un área estéril donde cada pulmón se colocó dentro de una caja de Petri y seleccionándose el área pulmonar a trabajar, se le colocó una espátula caliente sobre dicha área quemando (esterilizando) la capa de células superficiales, con las tijeras estériles se cortó el área y se tomó la muestra con el asa de inoculación estéril, y se procedió a sembrar en el medio de cultivo agar sangre, posteriormente se incubó a 37°C por un periodo de 24 a 48 hrs, y al observar el desarrollo de colonias características se procedió a hacer la identificación bacteriológica.

La identificación primaria de las bacterias se realizó basándose en las pruebas primarias descritas por Cowan y Steel (1979) ver Anexo.

Pruebas de sensibilidad

Las pruebas de sensibilidad se realizaron por triplicado, empleando agar Mueller Hinton y utilizando la técnica de dilución en agar, que es un método considerado por el instituto de estándares clínicos y de laboratorio (CLSI del inglés *Clinical and Laboratory Standards Institute*) como un método de referencia para el estudio de la sensibilidad antimicrobiana (Gómez *et al.*, 2009).

Preparación de los inóculos.

A partir de cultivos de *Pasteurella multocida* de 24 hrs a 35°C. En agar Mueller Hinton, se prepararon suspensiones en solución salina fisiológica a una densidad equivalente al tubo 0.5 de Mc Farland (DO de 0.09-0.17, 80-82% de transmitancia) lo cual corresponde a una concentración de 1×10^8 Unidades formadoras de colonia (UFC) por ml.

Preparación del "Stock" de propóleo.

Para la preparación del stock de propóleo se utilizaron únicamente los Extracto Etanólico de Propóleo (EEP) que fueron secados por evaporación en campana de vacío, para lo cual se realizó lo siguiente:

- ❖ Se pesaron 6 mg del EEP en un tubo Eppendorf utilizando la balanza analítica.
- ❖ Posteriormente se le añadió 1 ml de etanol al 70% y se agitó en el vortex (Figura 10).

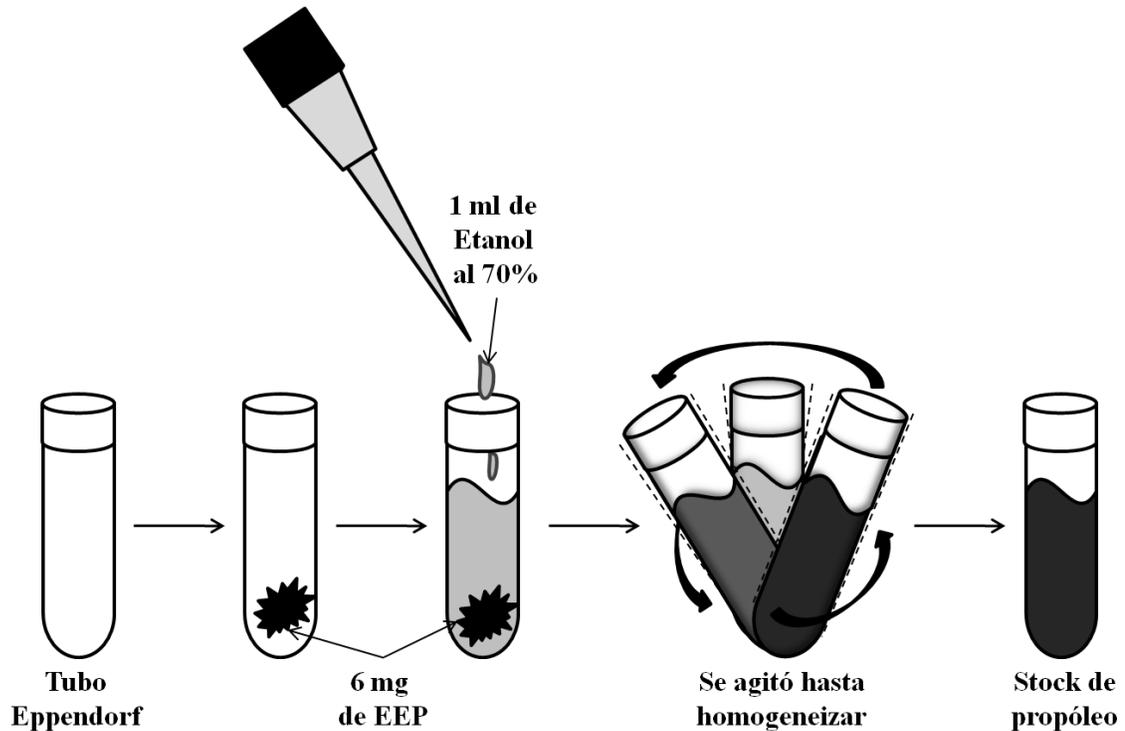


Figura 10 El esquema muestra como fue realizado el stock de propóleo que se utilizo en las pruebas de sensibilidad

Por otro lado también se preparo el agar Mueller Hinton según las indicaciones dadas por el fabricante "BD Bioxon".

El medio fue servido en tubos a razón de 6 ml por tubo y se esterizaron en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Una vez que el medio estéril tuvo una temperatura de 45°C se comenzó a trabajar de la siguiente manera:

- ❖ A cada tubo le fue retirado 50, 100 ó 150 μ L del agar para después ser sustituidos por 50, 100 ó 150 μ L del stock de propóleo, posteriormente fueron homogeneizados cuidadosamente utilizando un vortex y vertidos en las cajas de Petri estériles con volumen para 10 ml.
- ❖ Para los controles positivos se empleo el medio Mueller Hinton integro a razón de 6ml por caja.

- ❖ También se prepararon medios control con etanol para lo cual también se retiraron 50, 100 ó 150 μL del agar para después ser sustituidos por 50, 100 ó 150 μL de etanol al 70% esto con la finalidad de demostrar que de haber inhibición en el crecimiento bacteriano el único responsable sería el propóleo y no así el disolvente utilizado.
- ❖ Todas las cajas fueron debidamente identificadas y se les llevó a prueba de esterilidad, donde fueron incubadas durante 24 horas a 35°C.

Inoculación.

Se inocularon las 10 cepas de *Pasteurella multocida* en los medios con los 5 diferentes propóleos a las diferentes concentraciones (0.3 mg/ml, 0.6 mg/ml y 0.9 mg/ml) a razón de 0.5 μL del inóculo colocada en el agar mediante una micropipeta y esparcida con un asa de inoculación y se incubaron durante 24 horas a 37°C, cumplido este tiempo se procedió a realizar la lectura.

Las 10 cepas de *Pasteurella multocida* se sembraron en agar Mueller Hinton y fueron empleados, como grupos control positivo agar Mueller Hinton y agar Mueller Hinton con etanol al 70%.

Cromatografía de gases y espectrometría de Masas.

El estudio cromatográfico y de espectrometría de masas se realizaron en el laboratorio de Farmacognosia de la Unidad de Biotecnología y Prototipos ubicados en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM.

Se realizó una cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas en un Cromatógrafo de gases (Modelo 6850) acoplado a un Espectro de masas (Modelo 5975C) ambos de la marca Agilent Technologies, fabricado en China; columna HP-5MS (fabricada en USA) de 30 metros de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y película de 0.25 mm.

La Columna utilizada por el cromatógrafo de gases es una columna Discovery C-18, con las siguientes características: 250 x 4.6 mm con un tamaño de partícula de 5 μm , se corrió de forma isocrática con una mezcla de metanol-acetonitrilo-agua (25-25-50) con un flujo de 1 ml/min y con un detector de arreglo de diodos (DAD) a una longitud de onda de 260 nm y realizando un barrido completo de 200-400 nm.

VI. RESULTADOS

Cepas bacterianas

En total se diseccionaron 14 tractos respiratorios y se tomaron 5 muestras nasales lográndose aislar 10 cepas bacterias identificadas como *Pasteurella multocida* tipo capsular D, con las cuales se trabajó.

Rendimiento de los propóleos.

A continuación en la Tabla 6 se presentan a detalle la cantidad de propóleo utilizado para la obtención del Extracto Etanólico de Propóleo (EEP), así como los gramos de extracto que se obtuvo en cada uno de ellos. Por otra parte en la Tabla 7 se muestra la manera en que fueron llevados a sequedad los extractos ya sea la alícuota en una campana de vacío por un periodo de 12 días o bien evaporado a temperatura ambiente en obscuridad y para lo cual se requirió el transcurso de 70 días, además se muestra el rendimiento para cada caso.

Tabla 6 Muestra el rendimiento de los 5 propóleos al pasar de propóleo bruto a extracto etanólico de propóleo.

Lugar de procedencia	Peso (g)	Propóleo utilizado (g)	EEP (g)	Rendimiento (%)
Albino Zertuche	404.4	100	20.15	20.15
Tlacotalpan	242.2	100	18.1	18.1
FES-C	141.2	100	22.6	22.6
San Juan del Rio	55.8	50	20.2	40.4
Valle de Santiago	412.4	100	43.6	43.6

Tabla 7 Muestra el rendimiento en peso seco de los EEP durante su proceso en que fueron llevados a sequedad, así como los gramos que se obtuvieron en cada uno de estos procesos.

Lugar de procedencia	Secado al vacío		Secado a temperatura ambiente		Total de EEP seco (g)
	Alícuota de EEP (g)	EEP seco (g)	EEP (g)	EEP seco (g)	
Albino Zertuche	170.8	4.4	471.6	15.75	20.15
Tlacotalpan	71.4	1.55	316.4	16.55	18.1
FES-C	177	4.5	511.65	18.1	22.6
San Juan del Rio	39.2	2.1	200	18.1	20.2
Valle de Santiago	41.2	8.5	300.2	35.1	43.6

Prueba de sensibilidad.

La lectura de la prueba se realizó a las 24 horas de la inoculación, se revisó cada una de las cajas y comparándose con sus controles positivos, donde todos los casos existió crecimiento de colonias de *Pasteurella multocida*.

Los propóleos colectados en los municipios de Albino Zertuche y Tlacotalpan tuvieron una concentración mínima inhibitoria (MIC del inglés *Minimum Inhibitory Concentration*) superior a las concentraciones probadas que fueron de 0.3 mg/ml, 0.6 mg/ml y 0.9 mg/ml ya que ninguna de estas fue suficiente para inhibir de manera total el crecimiento de *Pasteurella multocida*.

La MIC para el propóleo de la FES-Cuautitlán corresponde a 0.9 mg/ml en tanto que para el proveniente del municipio de San Juan del Rio, la MIC fue de ≥ 0.3 mg/ml y para el del municipio de Valle de Santiago la MIC correspondió a ≤ 0.6 mg/ml.

En la Tabla 8 se muestran los resultados generales de las pruebas de inhibición donde se puede observar que, la inhibición de *P. multocida* con la concentración más baja probada 0.3 mg/ml fue obtenida por el propóleo de San Juan del Rio ya que este logro inhibir su crecimiento de manera total en 75 de las 90 pruebas realizadas, siéndolos extractos de Tlacotalpan y Puebla los que no tuvieron buena inhibición en ninguna de las tres concentraciones probadas, 0.3, 0.6 y 0.9mg/ml el que, en menos ocasiones lograra este tipo de actividad. De esta manera se presenta un resumen del número de veces que se obtuvo inhibición parcial, total o bien no se logro inhibir el crecimiento de la *Pasteurella* por parte de cada uno de los propóleos probados.

Tabla 8 Resultados de la prueba de sensibilidad *in vitro* de *P. multocida* frente a los 5 EEP, provenientes de los diferentes municipios de la República Mexicana.

	Albino Zertuche	Tlacotalpan	FES-C	San Juan del Rio	Valle de Santiago
Sin inhibición	42	45	15	6	6
Inhibición parcial	9	9	9	9	21
Inhibición total	39	36	66	75	63

En la Tabla 9 se muestran los resultados del promedio obtenido de las 3 repeticiones realizadas para cada uno de los 5 propóleos contra las 10 diferentes cepas de *Pasteurella multocida* y se anota 0 para indicar que no hay inhibición, + para indicar una inhibición parcial y finalmente ++ indican una inhibición total de la cepas de *P multocida*. También se muestra la prueba control positivo donde se observa que existe un crecimiento normal de las cepas en el agar Mueller-Hinton.

Tabla 9 Resultados de la prueba de sensibilidad *in vitro* de *Pasteurella multocida* frente a 5 EEP provenientes de diferentes municipios de la República, a tres diferentes concentraciones (0.3 mg/ml, 0.6 mg/ml y 0.9 mg/ml).

EEP	Cepa	Concentraciones			Control
		[0.3 mg/ml]	[0.6 mg/ml]	[0.9 mg/ml]	
Albino Zertuche	1	++	++	++	0
	2	0	0	0	0
	3	0	+	++	0
	4	0	0	0	0
	5	0	0	0	0
	6	++	++	++	0
	7	0	++	++	0
	8	0	0	0	0
	9	++	++	++	0
	10	+	+	++	0
Tlacotalpan	1	++	++	++	0
	2	0	0	0	0
	3	0	0	0	0
	4	0	0	0	0
	5	0	0	0	0
	6	+	++	++	0
	7	++	++	++	0
	8	0	0	0	0
	9	++	++	++	0
	10	+	+	++	0
FES-C	1	+	++	++	0
	2	0	++	++	0
	3	+	++	++	0
	4	0	0	0	0
	5	++	++	++	0
	6	++	++	++	0
	7	++	++	++	0
	8	0	+	++	0
	9	++	++	++	0
	10	++	++	++	0
San Juan del Rio	1	++	++	++	0
	2	+	++	++	0
	3	++	++	++	0
	4	0	+	++	0
	5	++	++	++	0
	6	++	++	++	0
	7	++	++	++	0
	8	0	+	++	0
	9	++	++	++	0
	10	++	++	++	0
Valle de Santiago	1	+	+	+	0
	2	0	++	++	0
	3	++	++	++	0
	4	0	++	++	0
	5	++	++	++	0
	6	++	++	++	0
	7	++	++	++	0
	8	+	+	+	0
	9	++	++	++	0
	10	+	++	++	0

Nota: 0: sin inhibición; +: inhibición parcial; y ++: inhibición total.

Análisis estadístico

Los datos de las pruebas de susceptibilidad “*in vitro*” de *Pasteurella multocida*, obtenidos por los 5 diferentes extractos etanólicos de propóleos probados, fueron comparados estadísticamente por X^2 .

Ayudados por el programa estadístico R 2.9.1

Empleando un nivel de significancia ($p < 0.05$)

En la Figura 11 se muestra que al realizar la comparación de la actividad mostrada por el propóleo de San Juan del Rio fue superior al de los propóleos de Albino Zertuche, Tlacotalpan se observó que hubo diferencia estadísticamente significativa entre estos de ($p < 0.001$) y entre los propóleos de San Juan del Rio y el propóleo FESC fue de ($p < 0.05$). De igual manera se observa que el propóleo de Valle de Santiago tuvo un efecto similar al de San Juan del rio no encontrándose diferencia estadística entre ellos.

Comparación de los resultados de la prueba de inhibición de los diferentes propóleos estudiados

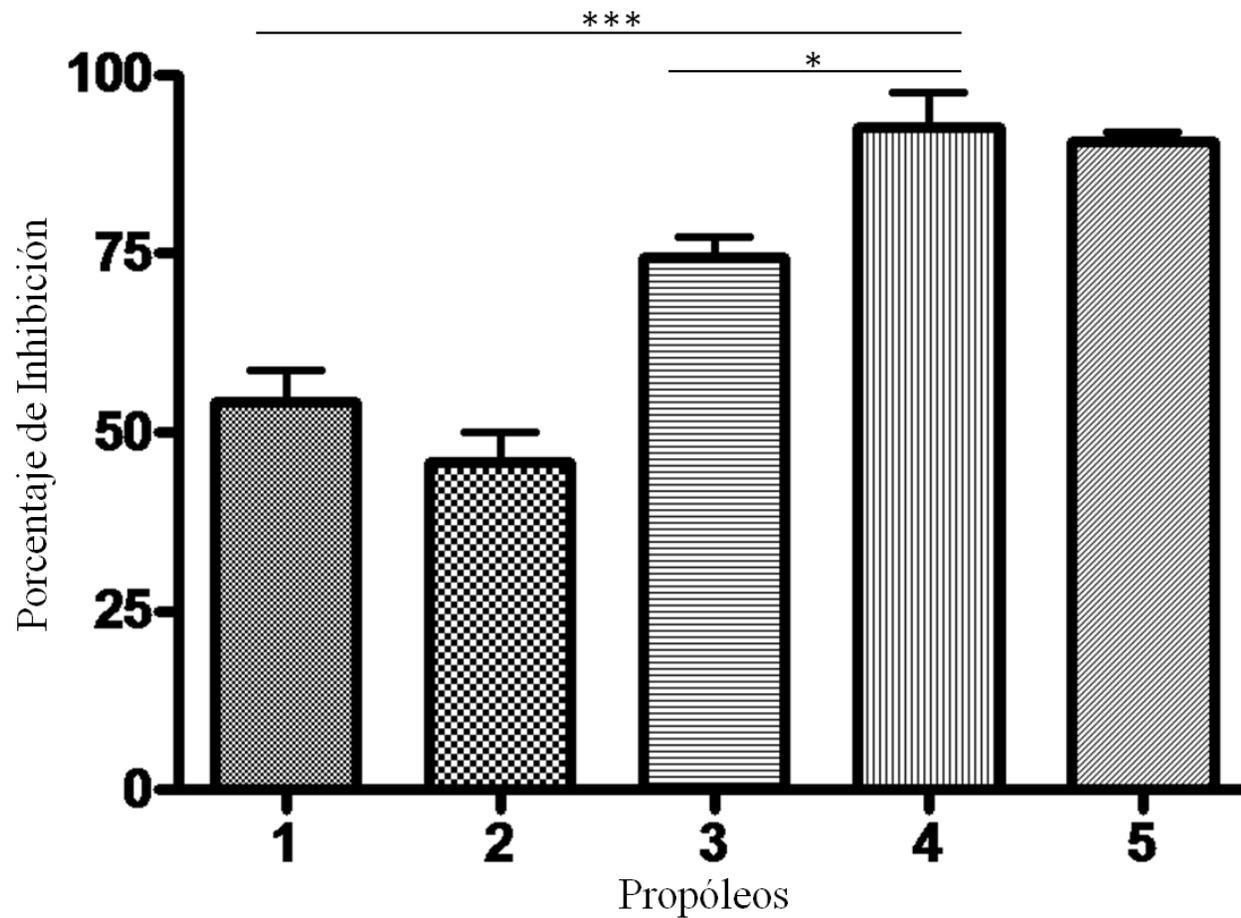


Figura 11 Comparación de los porcentajes de cepas de *Pasteurella multocida* inhibidas por los propóleos de 1 Albino Zertuche, 2 Tlacotalpan, 3 FESC, 4 San Juan del Rio y 5 Valle de Santiago. Diferencia estadísticamente significativa entre los propóleos estudiados, *** ($p < 0.001$), * ($p < 0.05$)

En la figura 12 podemos ver el control positivo de agar Mueller Hinton con crecimiento de colonias y agar Mueller Hinton con etanol al 5, 10 y 15% y se ve el crecimiento de *Pasteurella multocida*. Y en la figuras 13, 14, 15, 16 y 17 ilustran las pruebas de sensibilidad de los diferentes propóleos Albino Zertuche, Tlacotalpan, FES-Cuautitlán, San Juan del Rio y Valle de Santiago respectivamente acompañados del su control positivo en la parte superior y en la parte inferior se observan las 3 concentraciones probadas 0.3, 0.6 y 0.9 mg/ml con una de las cepas trabajadas.

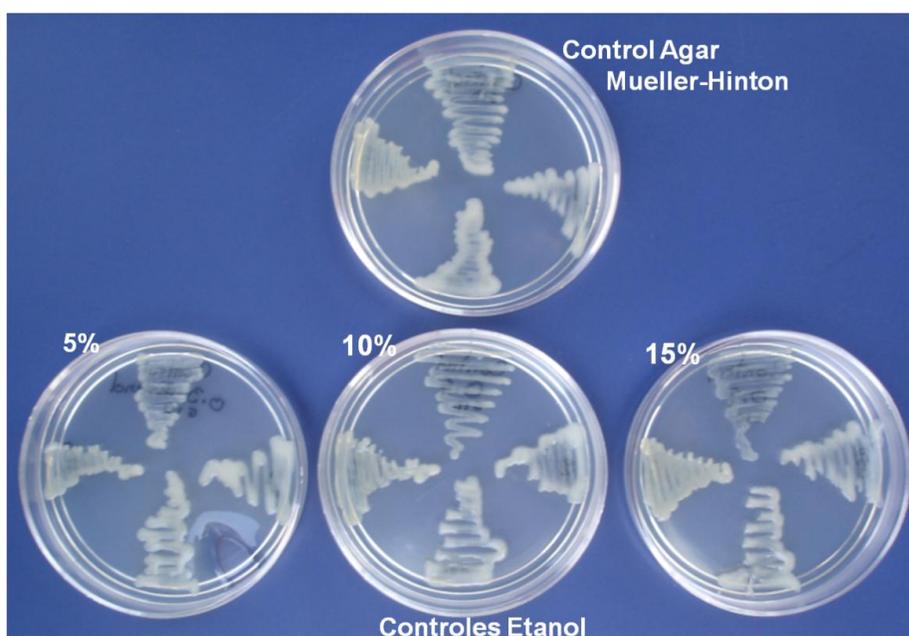


Figura 12 Arriba se muestra el control (Agar Mueller-Hinton), abajo se muestran 3 diferentes concentraciones [5%, 10% y 15%] de etanol al 70%, todas con crecimiento normal.

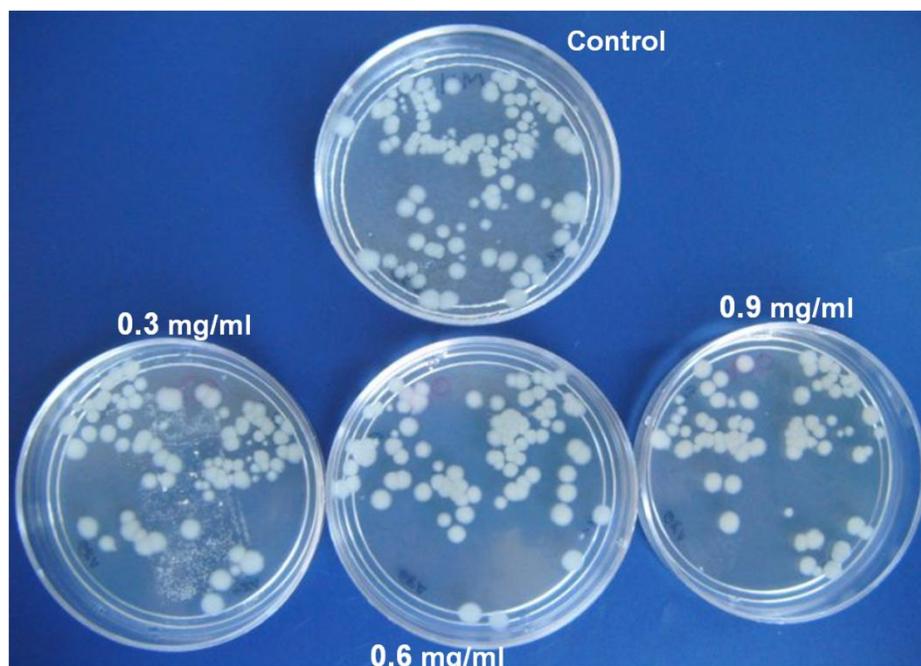


Figura 13 Arriba se muestra el control (Agar Mueller-Hinton) con crecimiento normal, abajo se muestran 3 diferentes concentraciones [0.3 mg/ml, 0.6 mg/ml y 0.9 mg/ml] del extracto etanólico de propóleo proveniente de Albino Zertuche.

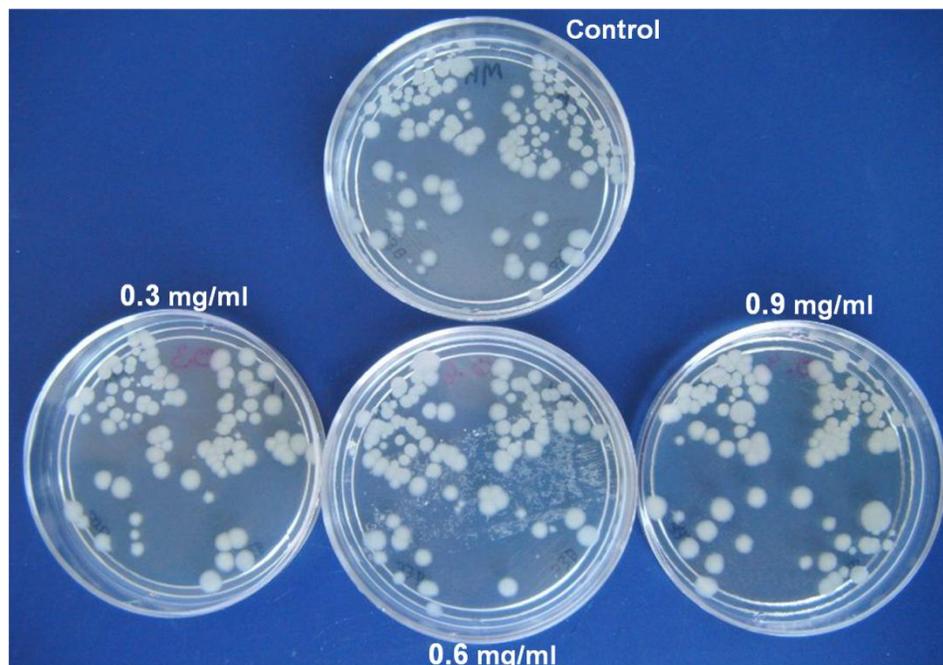


Figura 14 Arriba se muestra el control (Agar Mueller-Hinton) con crecimiento normal, abajo se muestran 3 diferentes concentraciones [0.3 mg/ml, 0.6 mg/ml y 0.9 mg/ml] del extracto etanólico de propóleo proveniente de Tlacotalpan.

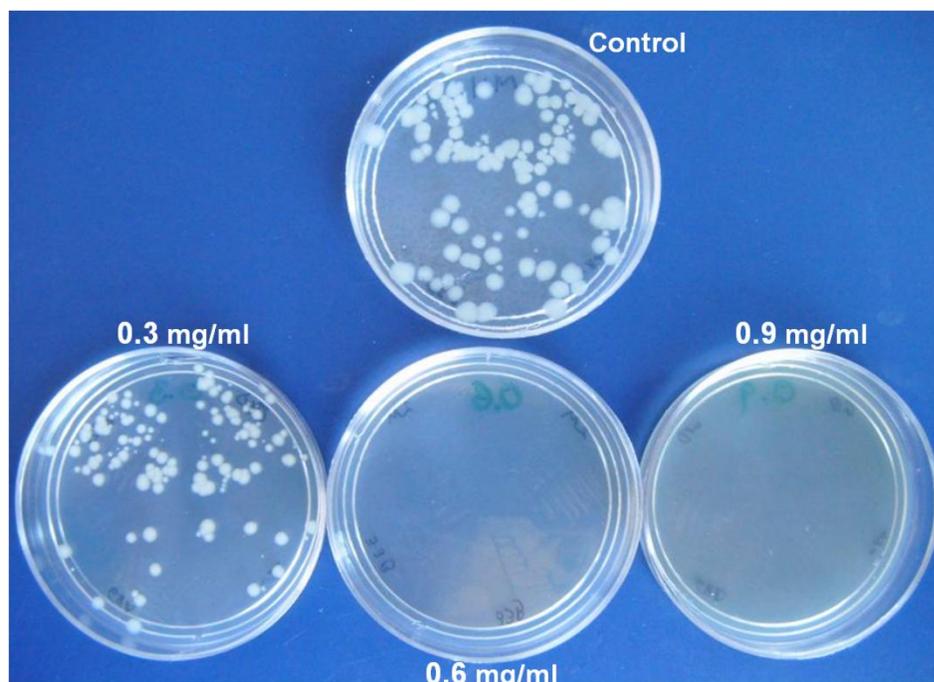


Figura 15 Arriba se muestra el control (Agar Mueller-Hinton) con crecimiento normal, abajo se muestran 3 diferentes concentraciones [0.3 mg/ml, 0.6 mg/ml y 0.9 mg/ml] del extracto etanólico de propóleo proveniente la FES-Cuautitlán.

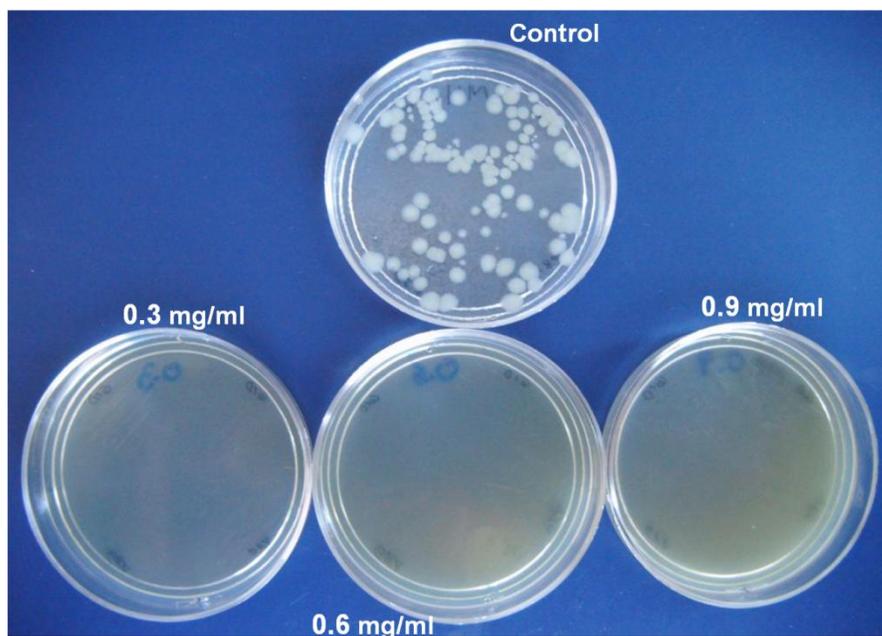


Figura 16 Arriba se muestra el control (Agar Mueller-Hinton) con crecimiento normal, abajo se muestran 3 diferentes concentraciones [0.3mg/ml, 0.6mg/ml y 0.9mg/ml] del extracto etanólico de propóleo de San Juan del Rio.

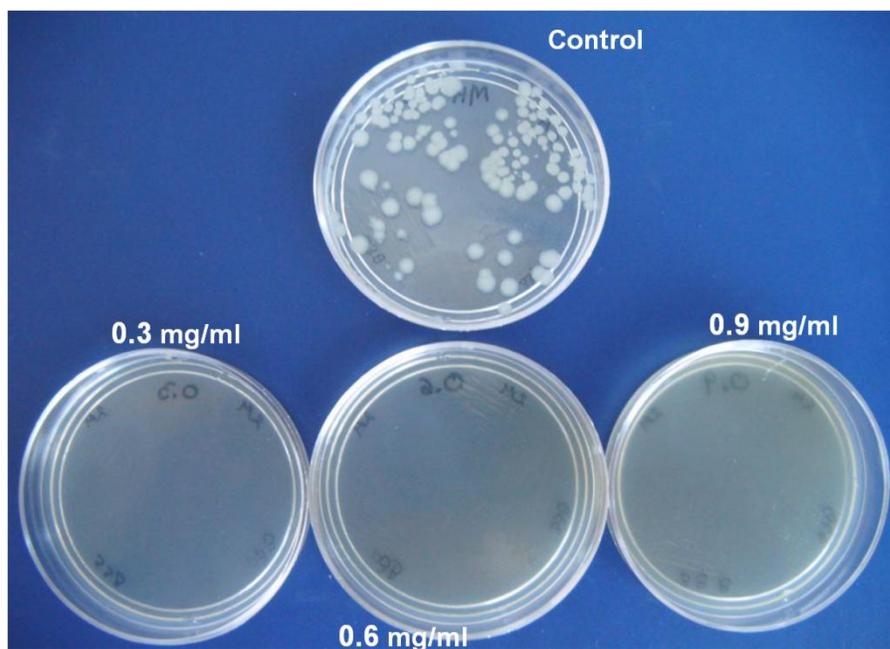


Figura 17 Arriba se muestra el control (Agar Mueller-Hinton) con crecimiento normal, abajo se muestran 3 concentraciones diferentes [0.3 mg/ml, 0.6 mg/ml y 0.9 mg/ml] del extracto etanólico de propóleo del municipio de Valle de Santiago con una inhibición total en las 3 concentraciones.

Análisis de los propóleos.

En primer lugar, se realizó un análisis general de los propóleos empleados en el presente trabajo y después el perfil químico de los mismos, estableciéndose las correlaciones existentes entre ellos.

Así, de acuerdo al análisis realizado por cromatografía de gases, se observa diferencia en la cantidad y composición química entre los EEP. En donde, se pueden contabilizar 33 compuestos para el propóleo de la FES Cuautitlán, 42 en el de Albino Zertuche, 48 en el de Valle de Santiago, 42 en el de San Juan del Rio y 16 en el de Tlacotalpan Tabla 10. En este sentido, es importante señalar que el número de componentes de un propóleo no necesariamente es significativo de su actividad antibacteriana, sino que es la naturaleza química de los componentes, así como la concentración de ellos en cada muestra, la que le confiera esa propiedad.

De acuerdo a la actividad que se observó contra *Pasteurella multocida* con los diferentes propóleos, en orden decreciente fue San Juan del Rio > Valle de Santiago > FES Cuautitlán > Albino Zertuche > Tlacotalpan. Esta actividad antibacteriana parece no estar relacionada con el número de componentes encontrados en cada propóleo. Un dato adicional importante es la época de producción de los propóleos, ya que su contenido químico está relacionado con las plantas que visitan las abejas para su producción; así, se hace mención que el propóleo de Albino Zertuche fue producido durante la época de verano de 2009, y que el resto de los propóleos se produjeron durante otoño de 2009 a excepción del propóleo de Valle de Santiago que ya pertenece a la primavera del 2010.

Tabla 10 Comparación de los tiempos de retención (TR) y porcentaje de abundancia obtenidos en la espectrometría de masas de los 5 propóleos.

PICOS	Propóleo de ALBINO ZERTUCHE		Propóleo de TLACOTALPAN		Propóleo FES-C		Propóleo de SAN JUAN DEL RIO		Propóleo de VALLE DE SANTIAGO	
	TR (min)	% TOTAL	TR (min)	% TOTAL	TR (min)	% TOTAL	TR (min)	% TOTAL	TR (min)	% TOTAL
1	4.391	4.436%	4.528	5.429%	4.408	7.363%	4.215	1.537%	4.369	0.607%
2	5.02	1.425%	4.793	4.604%	4.536	3.190%	5.037	0.780%	4.549	6.294%
3	5.072	1.632%	5.187	8.198%	4.828	0.355%	5.247	1.160%	4.806	1.148%
4	5.247	12.630%	5.431	1.546%	5.226	24.300%	7.281	0.380%	5.299	15.203%
5	6.219	0.763%	5.723	2.333%	5.457	2.081%	9.786	1.528%	5.457	5.858%
6	6.455	3.165%	6.087	0.931%	5.958	4.389%	10.039	0.399%	5.744	4.335%
7	6.862	1.961%	6.189	61.992%	6.108	25.522%	15.096	0.273%	6.108	10.990%
8	6.922	1.007%	6.695	1.355%	6.463	0.406%	16.564	0.327%	6.211	25.385%
9	7.256	0.686%	8.343	1.502%	6.712	17.458%	16.757	0.408%	6.472	0.824%
10	7.337	4.878%	8.913	1.011%	6.887	0.685%	17.408	0.310%	7.294	0.396%
11	8.168	1.649%	9.140	1.213%	7.26	0.557%	17.926	0.302%	7.452	0.280%
12	8.236	0.804%	10.835	2.282%	7.384	0.548%	18.718	1.269%	8.236	0.601%
13	8.647	0.865%	11.032	2.062%	7.457	0.395%	19.806	0.485%	8.72	0.254%
14	9.033	1.076%	13.156	3.309%	7.876	0.280%	20.504	2.885%	8.917	1.010%
15	9.538	0.853%	14.124	0.758%	8.202	0.328%	20.923	1.539%	9.088	0.752%
16	9.782	9.610%	29.415	1.474%	8.917	1.659%	22.242	2.180%	9.144	0.414%
17	10.146	0.793%			9.337	1.105%	22.482	0.275%	9.277	0.542%
18	10.27	1.524%			9.786	1.168%	22.619	3.606%	9.658	0.347%
19	11.028	3.934%			10.548	0.366%	22.863	0.622%	9.786	0.566%
20	12.026	1.967%			10.698	0.287%	22.906	0.776%	10.034	0.365%
21	12.377	0.985%			10.848	0.495%	22.966	4.422%	10.835	1.573%
22	12.792	0.759%			11.405	0.626%	23.24	0.287%	10.882	0.488%
23	13.028	0.707%			11.764	0.273%	23.356	1.459%	10.994	0.298%
24	13.533	0.685%			12.801	0.536%	23.557	0.852%	11.349	0.381%
25	15.764	1.183%			14.638	0.397%	23.895	1.053%	12.15	0.324%
26	16.569	1.090%			16.479	0.606%	24.375	0.571%	12.385	0.354%
27	16.757	1.824%			17.408	0.303%	24.443	0.643%	13.156	1.551%
28	17.293	0.761%			20.491	0.297%	24.49	1.545%	13.383	0.271%
29	17.408	1.014%			22.238	0.360%	24.906	0.461%	14.119	0.311%
30	17.609	1.489%			26.439	2.290%	25.616	0.414%	14.633	0.441%
31	17.858	1.224%			28.199	0.669%	25.736	0.756%	15.113	1.082%
32	17.931	1.044%			28.503	0.366%	26.113	0.773%	16.479	0.338%
33	19.147	1.291%			28.974	0.337%	26.443	26.455%	16.663	0.378%
34	19.853	0.686%					26.546	2.418%	20.5	0.317%
35	20.093	0.923%					27.385	0.514%	20.924	0.309%
36	20.491	1.675%					27.436	2.760%	22.238	0.379%
37	20.624	0.997%					28.113	1.480%	22.615	0.404%
38	22.213	0.834%					28.207	8.753%	22.966	0.422%
39	22.487	1.280%					28.331	6.937%	23.934	0.334%
40	23.934	1.219%					28.798	5.202%	24.268	0.381%
41	26.97	21.926%					28.974	8.463%	26.469	9.272%
42	28.503	0.747%					29.77	2.741%	27.441	0.463%
43									28.113	0.263%
44									28.211	1.769%
45									28.331	0.733%
46									28.515	0.275%
47									28.798	0.328%
48									28.969	0.391%

En las tablas 11 a la 15 se presentan los nombres de los compuestos propuestos por el equipo de espectrometría de masas de los 5 propóleos analizados por cromatografía de gases acoplado a masas, se muestra también el tiempo de retención y porcentaje de abundancia que se obtuvo por la cromatografía.

Tabla 11 Tiempos de retención, porcentajes y la propuesta del compuesto de acuerdo a la base de datos del equipo de espectrometría de masas y la aplicación de criterio químico del propóleo del municipio de Albino Zertuche-Puebla.

PICOS	T R (min)	% TOTAL	COMPUESTO PROPUESTO DE ACUERDO A LA BASE DE DATOS DEL ESPECTRÓMETRO DE MASAS
1	4.391	4.436%	1,2 -Ciclopentanedione
2	5.02	1.425%	Benzaldehído
3	5.072	1.632%	2-Ciclopenteno-1-one,3-metil-
4	5.247	12.630%	Fenol
5	6.219	0.763%	DL-Leucina,N-glicil-
6	6.455	3.165%	Benzaldehído,a-hidroxi-
7	6.862	1.961%	Acetofenona
8	6.922	1.007%	Ácido acético, 6-morfolina-4-il-9oxobicyclo[3.3.1]no-3-
9	7.256	0.686%	1,2-Ciclopentanedion,3-metilo
10	7.337	4.878%	1-Butanol,3-metil- ,acetato
11	8.168	1.649%	Ciclohexano,1-metoxilo-
12	8.236	0.804%	4H-Piran-4-one,2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metilo-
13	8.647	0.865%	Fenol,3,5-dimetolo-
14	9.033	1.076%	1,2,6-Hexanetriol
15	9.538	0.853%	Benzofurano,2,3-dihidro-
16	9.782	9.610%	Benzotiazol
17	10.146	0.793%	3-Etilo-6-trifluoroacetoxioctano
18	10.27	1.524%	Formamide,N-cicloexil-
19	11.028	3.934%	Phenol,2-methyl-5-(1-metiloetil)-
20	12.026	1.967%	Benzaldehyde,4-hydroxy-
21	12.377	0.985%	2-Furan metanol,5-etenil tetrahidro-a,a-5-trimetil-,c
22	12.792	0.759%	Difenil éter
23	13.028	0.707%	Disulfuro, metil(metiltio)fenilmetil
24	13.533	0.685%	5,6,7,8,9,10-Hexahidrobencocloocteno
25	15.764	1.183%	1-Isoleucina,N-propoxicarbonil-, éster etilo
26	16.569	1.090%	(1R,3R,4R,5R)-(-)-Ácido quínico
27	16.757	1.824%	2- Benzotiazolamina,N-etilo-
28	17.293	0.761%	2(3H)-Benzothiazol
29	17.408	1.014%	Fenol, 4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)-
30	17.609	1.489%	Fenol, 4-(1,1-dimetilpropil)-
31	17.858	1.224%	(-)-Espatulenol
32	17.931	1.044%	Leden oxide-(l)
33	19.147	1.291%	Fenol, 4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)_
34	19.853	0.686%	Oxido aromadendreno
35	20.093	0.923%	(7R)-trans-sys-cis-triciclo[7.3.0.0(2,6)]-dodecano-7-ol
36	20.491	1.675%	Ácido palmítico, éster metilo
37	20.624	0.997%	Estra-1,3,5(10)-trien-17B-ol
38	22.213	0.834%	4,5,6-Metheno-1,2-benzisoxazole,3a,4,5,6,7,7a-hexal
39	22.487	1.280%	Ácido palmítico, 16- éster metilo
40	23.934	1.219%	N,N-Dimetil dodecanamide
41	26.97	21.926%	Ácido 1,2-bencenodicarboxílico, ftalato de diisooctilo
42	28.503	0.747%	Ácido palmítico, 1-(hidroxi metil)1,2-etanedil

Tabla 12 Tiempos de retención, porcentajes y la propuesta del compuesto de acuerdo a la base de datos del equipo de espectrometría de masas y la aplicación de criterio químico del propóleo de Tlacotalpan-Veracruz.

PICOS	T R (min)	% TOTAL	COMPUESTO PROPUESTO DE ACUERDO A LA BASE DE DATOS DEL ESPECTRÓMETRO DE MASAS
1	4.528	5.429%	1-R-a-Pineno
2	4.793	4.604%	Canfeno
3	5.187	8.198%	Biciclo[3.1.0]hexano,4-metileno-1- (1-metiletil)-
4	5.431	1.546%	Biciclo[3.1.0]hexano,4-metileno-1- (1-metiletil)-
5	5.723	2.333%	Biciclo[3.1.0]hexano,4-metileno-1- (1-metiletil)-, derivado didehidro
6	6.087	0.931%	Benzene,1-methyl-2-(1-methylethyl)
7	6.189	61.992%	Limoneno
8	6.695	1.355%	1,4-Ciclohexadieno,1-metil-4-(1-metiletil)-
9	8.343	1.502%	Biciclo[2.2.1]heptano-2-one,1,7,7-trimetil-,(1R)-
10	8.913	1.011%	3-Ciclohexeno-1-ol,4-metil-1-(1-Metiletil)-, @-
11	9.14	1.213%	3-Ciclohexeno-1-methanol,a,a4-trimetil-
12	10.835	2.282%	3-Ciclohexeno-1-methanol,a,a4-trimetil-
13	11.032	2.062%	Phenol,2-methyl-5-(1-methylethyl)-
14	13.156	3.309%	Cariofileno
15	14.124	0.758%	1H-Ciclopenta[1,3]ciclopropa[1,2]benzeno,octahidro-7-metil-3-metileno
16	29.415	1.474%	3',5'-diacetoxi-3,3',7'-trimetoxiflavona

Tabla 13 Tiempos de retención, porcentajes y la propuesta de los compuestos dados por la base de datos del equipo de espectrometría de masas y la aplicación de criterio químico del propóleo de FESC-Estado de México.

PICOS	T R (min)	% TOTAL	COMPUESTO PROPUESTO DE ACUERDO A LA BASE DE DATOS DEL ESPECTRÓMETRO DE MASAS
1	4.408	7.363%	Biciclo[3.1.0]hexano,4-metil-1-(1-metiletil)-,didel
2	4.536	3.190%	1 R-a- Pineno
3	4.828	0.355%	Canfeno
4	5.226	24.300%	Biciclo[3.1.0]hexano,4-metileno-1-(1-metil etil)
5	5.457	2.081%	Biciclo [3.1.1]heptano, 6,6-dimetileno-,(1S)-
6	5.958	4.389%	1,3-Cyclohexadiene, 1-methyl-4-(1-metil etil)-
7	6.108	25.522%	Benceno, 1-metil-2-(1-metil etil)-
8	6.463	0.406%	Benzaldehido,2-hidroxi-
9	6.712	17.458%	1,4-Ciclohexadieno, 1-metil-4-(1-metil etil)-
10	6.887	0.685%	Terpineol, cis-β-
11	7.26	0.557%	Ciclohexano, 1-metil-4-(1-metil etilideno)-
12	7.384	0.548%	Ciclohexano, 1-metil-4-(1-metil etilideno)-
13	7.457	0.395%	Terpineol, cis-β-
14	7.876	0.280%	2-Ciclohexen-1-ol,1-metil-4-(1-metil etil)-,trans-
15	8.202	0.328%	Nicoxamat
16	8.917	1.659%	3-Ciclohexen-1-ol,4-metil-1-(1-metil etil)-,@-
17	9.337	1.105%	Decanal
18	9.786	1.168%	Benzotiazole
19	10.548	0.366%	3-Hexyne-2,5-diol,2,5-dimetil-
20	10.698	0.287%	3,3-Diisopropil-1-(2,2,2-trifluoro etil)azetidina-2,4-dioene
21	10.848	0.495%	3-Hexyne-2,5-diol,2,5-dimethyl-
22	11.405	0.626%	4,4-Dimetilpentano-2-enal
23	11.764	0.273%	Benzenemethanol,3-hydroxy-
24	12.801	0.536%	Dodecanal
25	14.638	0.397%	1-Hidroxi-1,7-dimetil-4-isopropil-2,7-ciclododecadieno
26	16.479	0.606%	tau-Cadinol
27	17.408	0.303%	Fenol,4-(1,1-dimetilpropil)-
28	20.491	0.297%	Ácido palmítico
29	22.238	0.360%	3.Furan ácido carboxilico,4-(2,3-dihidro-1-oxo-1H-inden-
30	26.439	2.290%	4H-1-Benzopirano-4-one,2,3-dihidro-5,7-dihidroxi-2-p
31	28.199	0.669%	Naringenina
32	28.503	0.366%	2-Ácido tiofenocarboxilico,5-nonil-
33	28.974	0.337%	Naringenina

Tabla 14 Tiempos de retención, porcentajes y la propuesta del compuesto de acuerdo a la base de datos del equipo de espectrometría de masas y la aplicación de criterio químico del propóleo de San Juan del Río-Querétaro.

PICOS	T R (min)	% TOTAL	DE ACUERDO A LA BASE DE DATOS DEL ESPECTRÓMETRO DE MASAS
1	4.215	1.537%	D-Stramine,O-2amino-2-deoxi-a-D-glucopiranosil-(14)-O-[O-2,6-diamino-
2	5.037	0.780%	Glicerina
3	5.247	1.160%	Fenol
4	7.281	0.380%	1,2,3-Propanetriol,monoacetate
5	9.786	1.528%	Benzotiazol
6	10.039	0.399%	1,2,3-Propanetriol,monoacetate
7	15.096	0.273%	Ácido dedecanoico
8	16.564	0.327%	2-Benzothiazolaminae,N-etil-
9	16.757	0.408%	2(3H)-Benotiazol
10	17.408	0.310%	Fenol,4-(1,1-dimetilpropil)-
11	17.926	0.302%	Fenol, 4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)-
12	18.718	1.269%	Hexadecanal
13	19.806	0.485%	2-Hepadecanona
14	20.504	2.885%	Ácido hexadecanoico
15	20.923	1.539%	Ácido hexadecanoico y su éster metílico
16	22.242	2.180%	[5,9-Dimethyl-1-(3-phenyl-oxiran-2-yl)-deca-4,8-dienylidene]-(2-phenyl-azisidin-1
17	22.482	0.275%	Metil éster del ácido 9-metilhepotadecanoico
18	22.619	3.606%	Ácido Oleico
19	22.863	0.622%	Ácido octadecanoico
20	22.906	0.776%	Éster etílico del ácido 9E,12E-octadecanoico
21	22.966	4.422%	Oleato etílico
22	23.24	0.287%	Acido octadecanoico y su éster etil
23	23.356	1.459%	Acido Oleico
24	23.557	0.852%	Alcohol behénico
25	23.895	1.053%	2-Hexynyl aldehido dietil acetal
26	24.375	0.571%	Octacosano
27	24.443	0.643%	1,2-Cyclohexanediol,1-methyl-4-(1-methylethyl)-
28	24.49	1.545%	2 nonadecanona
29	24.906	0.461%	Éster etil del ácido 3-hidroxitridecanoico,
30	25.616	0.414%	2-Propen-1-one,1-(2,6-dihydroxy-4-methoxyphenyl)-3-phenyl-,E-
31	25.736	0.756%	Acetato de Z-(13,14-epoxitetradec-11-en-1-il
32	26.113	0.773%	2-Isopropyl-5-methyl-6-oxabicyclo[3.1.0]hexane-1-carboxaldehyde
33	26.443	26.455%	Pinocembrina
34	26.546	2.418%	2-Miristinoil panteteina
35	27.385	0.514%	1-[2-(hexadeciloxi)etoxi]octadecano
36	27.436	2.760%	Naringenina
37	28.113	1.480%	Naringenina
38	28.207	8.753%	Naringenina
39	28.331	6.937%	Crisina
40	28.798	5.202%	4H-1-Benzopirano-4-i5,7-dihidroxi-2- (4-hidroxifenil)-
41	28.974	8.463%	Naringenina
42	29.77	2.741%	Naringenina

Tabla 15 Tiempos de retención, porcentajes y la propuesta del compuesto de acuerdo a la base de datos del equipo de espectrometría de masas y la aplicación de criterio químico del propóleo de Valle de Santiago-Guanajuato.

PICOS	T R (min)	% TOTAL	COMPUESTO PROPUESTO DE ACUERDO A LA BASE DE DATOS DEL ESPECTRÓMETRO DE MASAS
1	4.369	0.607%	Triciclo[2.2.1.0(2,6)]heptano,1,7,7-trimetil-
2	4.549	6.294%	1R-a-Pineno
3	4.806	1.148%	Camfeno
4	5.299	15.203%	Biciclo[3.1.1]heptano,6,6-dimetil-2-metileno-,(1S)-
5	5.457	5.858%	β-Myrceno
6	5.744	4.335%	Biciclo[3.1.0]hexano,4-metil-1-(1-metil etil)-,derivado didehidro.
7	6.108	10.990%	Benzeno, 1-metil-3-(1-metil etil)-
8	6.211	25.385%	Biciclo[3.1.0]hex-2-ene, 4-metil-1-(1-metil etil)-
9	6.472	0.824%	1,3,6-Octatriene,3,7-dimethyl-,(Z)-
10	7.294	0.396%	Biciclo{2.2.1}heptano-2-one,1,3,3-trimetil-
11	7.452	0.280%	Ciclohexano,2-etencil-1,1-dimetil-3metileno-
12	8.236	0.601%	Biciclo[3.1.1]heptano-3-ol,6,6-dimetil-2-metileno-,[1S-(1a,3a,5a)]-
13	8.72	0.254%	Isobomeol
14	8.917	1.010%	3-Ciclohexen-1-ol,4-metil-1-(1-metil etil)-,(R)
15	9.088	0.752%	2-Ciclohexen-1-one,4-(1-trimetil)-
16	9.144	0.414%	3-Ciclohexene-1-metanol,a,a4-trimetil-
17	9.277	0.542%	(1R)-(-)-Mirtenal
18	9.658	0.347%	2,6-Octadiene,1-(1-etoxietoxi)-3,7-dimetil-
19	9.786	0.566%	Benzotiazol
20	10.034	0.365%	Benzaldehído,4-(1-metil etil)-
21	10.835	1.573%	Bomyl acetate
22	10.882	0.488%	Benzoenemethaol,4-(1-metil etil)-
23	10.994	0.298%	1-Ciclopentano-1-metanol,2-metil-5-(1-metil etil)-
24	11.349	0.381%	(1S,2S,3R,5S)-(+)-Pinediol
25	12.15	0.324%	5-Iodo-2,7-dioxa-tricyclo[4.2.1.0(3,8)]decane
26	12.385	0.354%	2(3H)-Benzofuranona,hexahidro-4,4,7a-trimetil-
27	13.156	1.551%	Cariofileno
28	13.383	0.271%	7-Oxabiciclo[4.1.0]heptano-2-one, 3-metil-6-(1-metil etil)-
29	14.119	0.311%	1H-Ciclopenta[1,3]ciclopropa[1,2]benzeno,octahidro-7-metil-3-metileno-
30	14.633	0.441%	1-Hydroxy-1,7-dimethyl-4-isopropyl-2,7-cyclodecadiene
31	15.113	1.082%	Cyclohexanemethanol,4-ethenyl-a,a,4-trimethyl-3-(1-methylethenyl)-,[1R-(1a,3
32	16.479	0.338%	tau Cadinol
33	16.663	0.378%	2-Naftalenometanol,decahidro-a,a,4a-trimetil-8-metileno-,[2R-(2a,4a
34	20.5	0.317%	Ácido palmítico
35	20.924	0.309%	Ácido palmítico y su éster de etilo
36	22.238	0.379%	4,5,6-Meteno-1,2-benzisoxazol,3a,4,5,6,7,7a-hexahidro-3-(2,4,6-trimetil
37	22.615	0.404%	Ácido Oleico
38	22.966	0.422%	Oleato Etilico
39	23.934	0.334%	Decanamide,N,N-dimetil-
40	24.268	0.381%	Thunbergol
41	26.469	9.272%	4H-1-Benzopirano-4-one,2,3-dihidro-5,7-dihidroxi-2-fenil-,(S)-
42	27.441	0.463%	Naringenina
43	28.113	0.263%	Naringenina
44	28.211	1.769%	Naringenina
45	28.331	0.733%	Crisina
46	28.515	0.275%	Ácido propanoico, 3-(4-aminocarbonil-1-piperidil)-,tert-butil éster
47	28.798	0.328%	4H-1-Benzopirano-4-one,5,7-dihidroxi-2-(4-hidroxifenil)-
48	28.969	0.391%	Naringenina

Los cromatogramas de los propóleos fueron significativamente diferentes, destacando las siguientes observaciones: el propóleo de San Juan del Rio contiene compuestos mayoritariamente más polares que los otros propóleos (compuestos de tipo flavonoide, de manera particular), mientras que los propóleos de la FESC y el de Tlacotalpan contienen principalmente compuestos no polares, de tipo monoterpénico. El propóleo de Valle de Santiago se caracterizó por contener ambos tipos de componentes, principal y mayoritariamente de tipo monoterpénico, y el propóleo de Albino Zertuche contiene componentes de baja (monoterpenos), media y alta polaridad (flavonoides).

Por otro lado, en cuanto a la naturaleza química de los componentes y su concentración en cada propóleo es necesario mencionar que esta última fue evaluada por cromatografía de gases, por lo que estos valores se tomarán como reales. Sin embargo, la identificación de cada componente se ha realizado con el apoyo de la biblioteca de la base de datos del equipo de espectrometría de masas, por lo que dicha identificación para este trabajo será considerada por estas sugerencias, siendo que el grado de confiabilidad es grande pero no definitiva.

Así, destaca a primera vista el propóleo de Tlacotalpan, el cual presenta un componente mayoritario (62%), propuesto como limoneno por la base de datos del espectrómetro de masas (Figura 18 y Tabla 12), metabolito secundario característico de los cítricos, como naranja, limón, mandarina, toronja, entre otros.

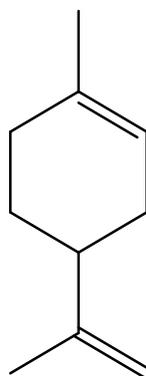


Figura 18 Limoneno

En cuanto al propóleo de San Juan del Rio, se observa que contiene un compuesto mayoritario (26.45%), propuesto como una flavanona, la 2,3-dihidro-5,7-dihidroxi flavona (Figura 19 y Tabla 14), llamada también pinocebrina, dihidrocrisina, pinostrobina o flavanona Galangina (The Online Chemical, 2010).

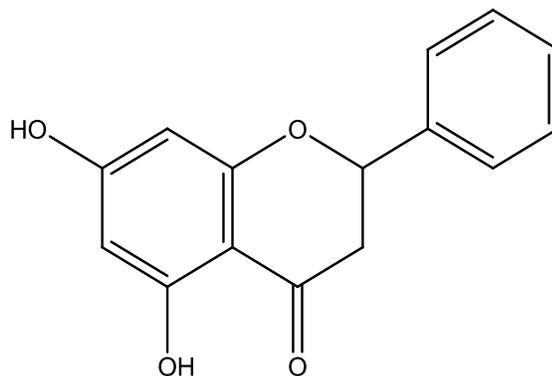


Figura 19 2,3-Dihidro-5,7-dihidroxi flavona

También para el propóleo del municipio de San Juan del Rio, es importante observar la gran cantidad en su contenido de derivados de cadena alifática grande saturada e insaturada, como el ácido dodecanoico, hexadecanal, 2-hepadecanona, ácido hexadecanoico y su éster metílico, el metil éster del ácido 9-metilheptadecanoico, ácido oleico y su etil éster, ácido octadecanoico y su éster de etilo, éster etílico del ácido 9*E*,12*E*-octadecadienoico, alcohol behénico o docosanol, octacosano, 2.nonadecanona, etil éster del ácido 3-hidroxitridecanoico, y el acetato de *Z*-(13,14-epoxitradec-11-en-1-il), 1-[2-(hexadeciloxi) etoxi]octadecano.

Además, en la parte polar de este propóleo se puede apreciar la existencia de compuestos flavonoides como la mencionada dihidrocrisina, la flavanona naringenina, también llamada naringetol, y su 2,3-dideshidro derivado.

Con respecto a los resultados obtenidos de la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, el equipo empleado señala que los picos con tiempo de retención de 27.436, 28.113, 28.207, 28.974 y 29.770 minutos, son asignados a la

naringenina (o tal vez a algunos de sus isómeros estructurales). Si esto se considera como cierto, el porcentaje de este compuesto en el propóleo es del 24.197%.

Otro flavonoide importante encontrado en este propóleo es la crisina, derivado 2,3-dideshidro de la dihidrocrisina (6.937%). Por último en cuanto al contenido de flavonoides en este propóleo se encuentra el 2,3-dideshidronaringenina en un porcentaje de 5.202%. Así, el contenido de todos los flavonoides en el propóleo de San Juan del Rio es de 62.786% como se muestra en la Tabla 16.

Con estas observaciones y con los resultados obtenidos en el presente trabajo, se podrá hacer una correlación entre el contenido de flavonoides, principalmente pinocembrina, naringenina y crisina, y la efectividad contra *Pasteurella multocida*, como los principales responsables de la actividad, a las concentraciones de 0.3 y 0.6 mg/ml de propóleo, ya que todo parece indicar que su contenido es crucial para la actividad evaluada en este trabajo.

Tabla 16 Porcentaje de flavonoides totales en los 5 propóleos estudiados.

Propóleo	Flavonoides Totales
Albino Zertuche	0%
Tlacotalpan	1.474%
FESC	3.296%
San Juan del Rio	62.786%
Valle de Santiago	12.891%

Finalmente para este propóleo, su contenido en compuestos de tipo terpénico es casi nulo, como se mencionó anteriormente, por lo que se puede inducir que estos compuestos participan poco o nada en la actividad contra *Pasteurella multocida*.

Realizando un análisis del contenido del propóleo de Valle de Santiago, se puede observar que contiene naringenina, aunque en un porcentaje menor (2.886%, considerando los porcentajes de cada pico registrados con ese nombre en el análisis de espectrometría de masas) que en el de San Juan del Rio. Con respecto a su contenido de pinocembrina, este propóleo contiene 9.272% y 0.733% de crisina, haciendo un total de

12.891%. Este menor contenido de flavonoides, indicaría una menor actividad contra *Pasteurella multocida*, lo que está de acuerdo con la evaluación experimental realizada a concentraciones ≤ 0.6 mg/ml de propóleo. Además, por la actividad antimicrobiana mostrada por este propóleo, se puede inducir que principalmente la menor concentración de la pinocembrina y de naringenina es la razón de su menor actividad biológica.

En cuanto al propóleo de la FESC se obtuvo que su contenido de naringenina es de 1.006%, de pinocembrina de 2.290%, mientras que la crisina no fue detectada. Así, es comprensible que esta menor concentración de flavonoides dio como resultado una menor actividad contra *Pasteurella multocida* con respecto a los de San Juan del Rio y Valle de Santiago, a concentraciones de 0.3 - 0.6 mg/ml de propóleo. Además, el gran contenido de compuestos menos polares, de tipo terpénico principalmente, es una característica de este propóleo.

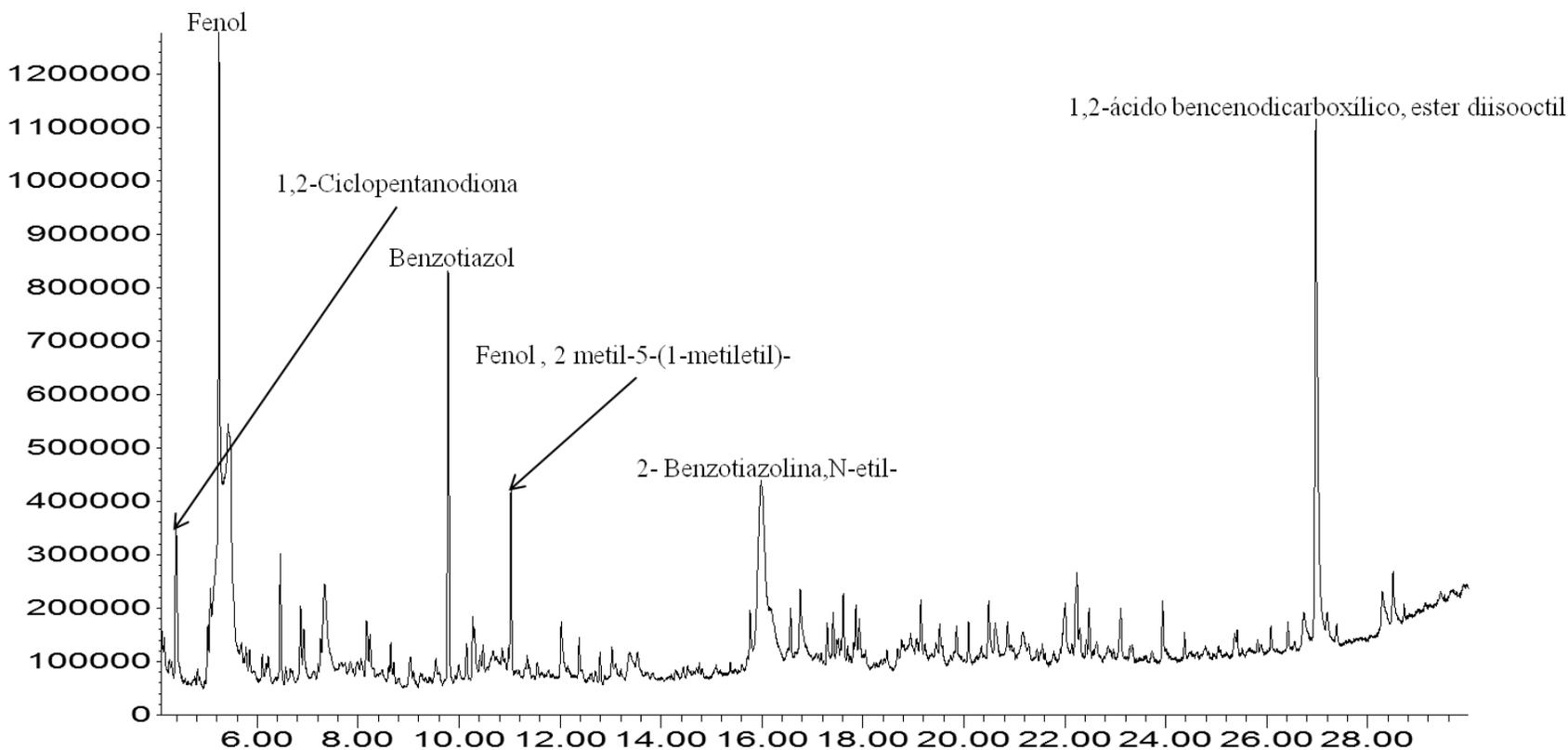
El propóleo poblano mostró menor actividad antimicrobiana con respecto a los tres propóleos presentados anteriormente, lo cual parece estar relacionado con la nula presencia de flavonoides. Al parecer su actividad biológica se puede establecer con respecto a su contenido en la gran variedad de compuestos químicos y al sinergismo que se pueda dar entre ellos en el propóleo, principalmente por la presencia del ftalato de diisooctilo, presente en un 21.926% y al fenol, contenido en 12.630%.

Por otro lado, el propóleo de Tlacotalpan fue el que mostró menor actividad antibacteriana, lo que se puede correlacionar a la ausencia de los flavonoides pinocembrina, naringenina y crisina. Aunque este material contiene un compuesto flavonoide, la 3',5-diacetoxi-3,3',7-trimetoxiflavona, en un 1.474%, su concentración al ser muy baja, solo es capaz de inhibir (incluyendo el sinergismo con los demás componentes del propóleo) el crecimiento de *Pasteurella multocida* en una proporción mucho menor que los otros propóleos, además de que los grupos hidroxilo presentes en ella están protegidos, lo que indica que para que un flavonoide presente actividad antibacteriana apreciable, es necesaria la presencia de los flavonoides hidroxilados.

Finalmente, es posible realizar una correlación entre el contenido de los componentes de los propóleos empleados en este trabajo, como se muestra en la Tabla 10; sin embargo, esta correlación parece no tener mayor influencia en la actividad contra *Pasteurella multocida*.

A continuación se muestran las figuras 20, 21, 22, 23 y 24 que corresponden a los cromatogramas de gases de cada uno de los propóleos analizados el de Albino Zertuche en de Puebla, Tlacotalpan en el Estado de Veracruz, Cuautitlán Izcalli en el Estado de México, San Juan del Rio en Querétaro y Valle de Santiago en el Estado de Guanajuato, respectivamente y en cada uno se señalan los picos que corresponden a los compuestos que reportaron mayor abundancia.

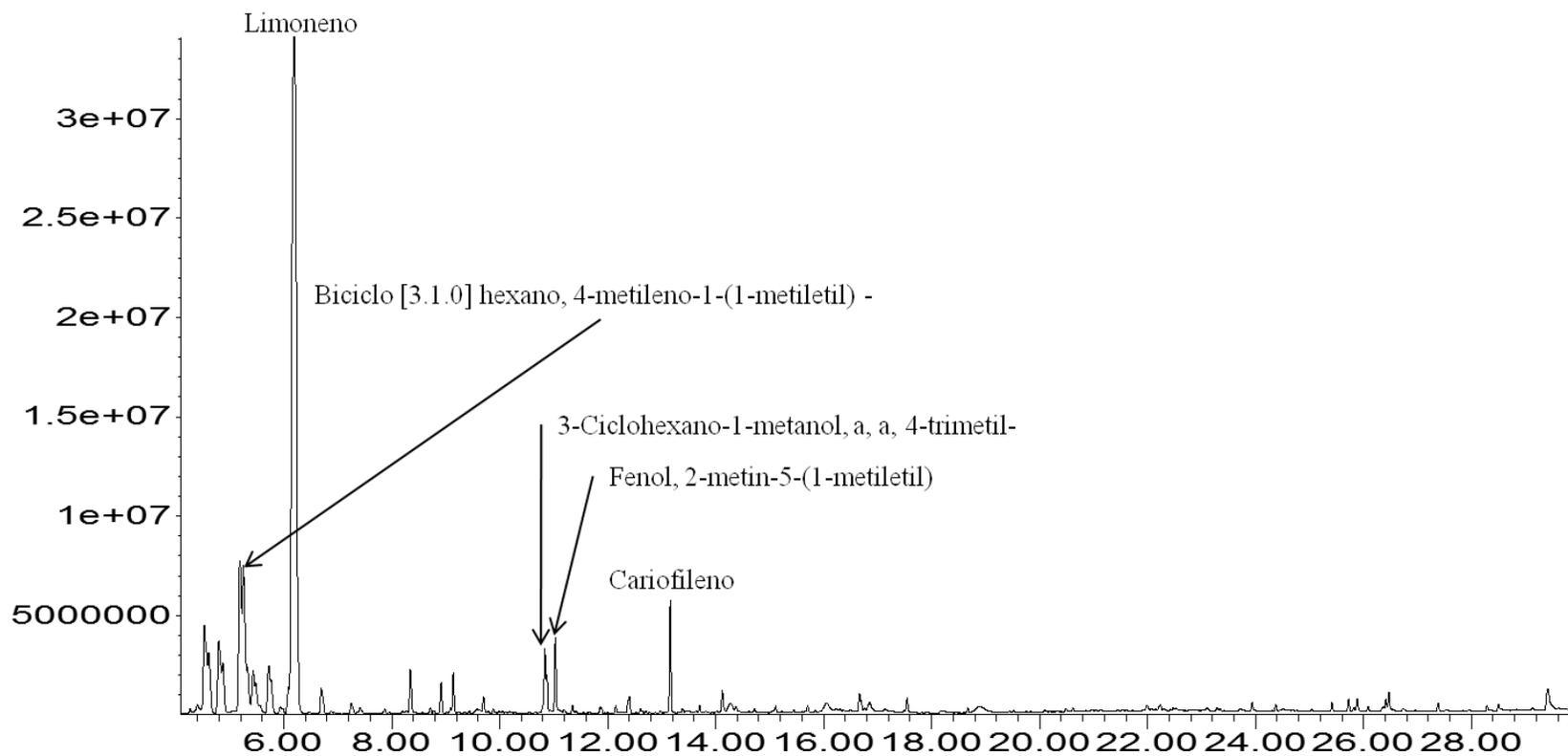
Abundance



Time-->

Figura 20 Cromatograma de gases del propóleo del municipio de Albino Zertuche, donde se muestran los nombres de los compuestos más abundantes.

Abundance



Time-->

Figura 21 Cromatograma de gases del propóleo del municipio de Tlacotalpan, donde se muestran los nombres de los compuestos más abundantes.

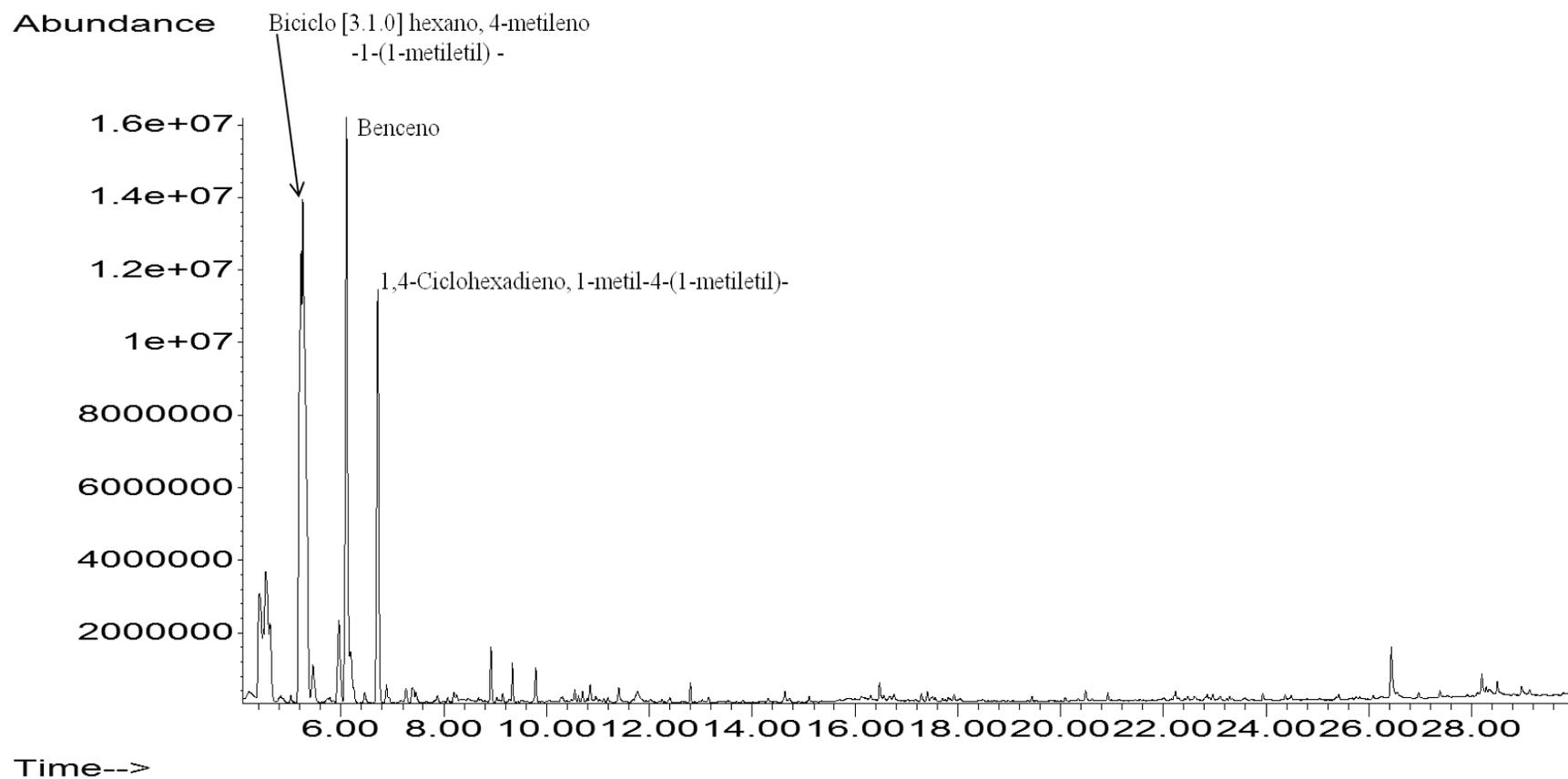
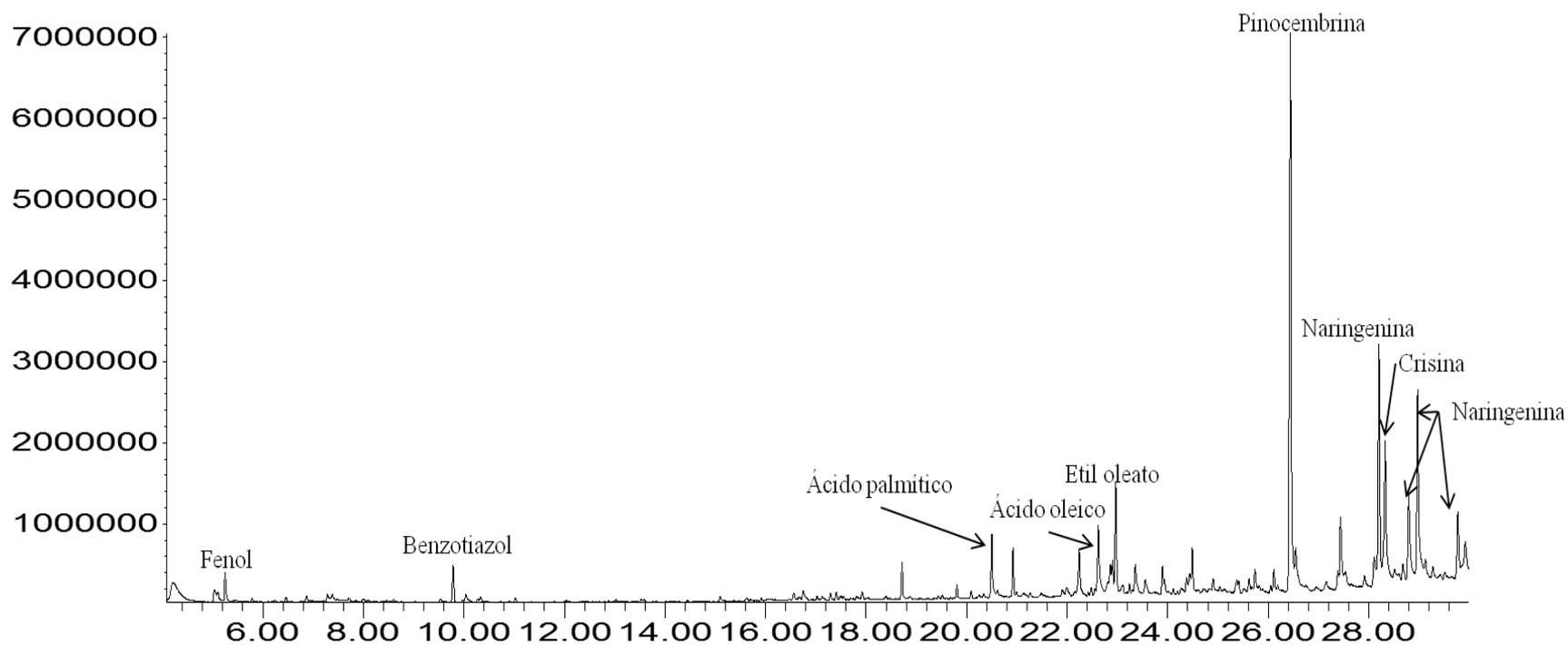


Figura 22 Cromatograma de gases del propóleo de la FES-C, donde se muestran los nombres de los compuestos más abundantes.

Abundance



Time-->

Figura 23 Cromatograma de gases del propóleo del municipio de San Juan del Rio, donde se muestran los nombres de los compuestos más abundantes.

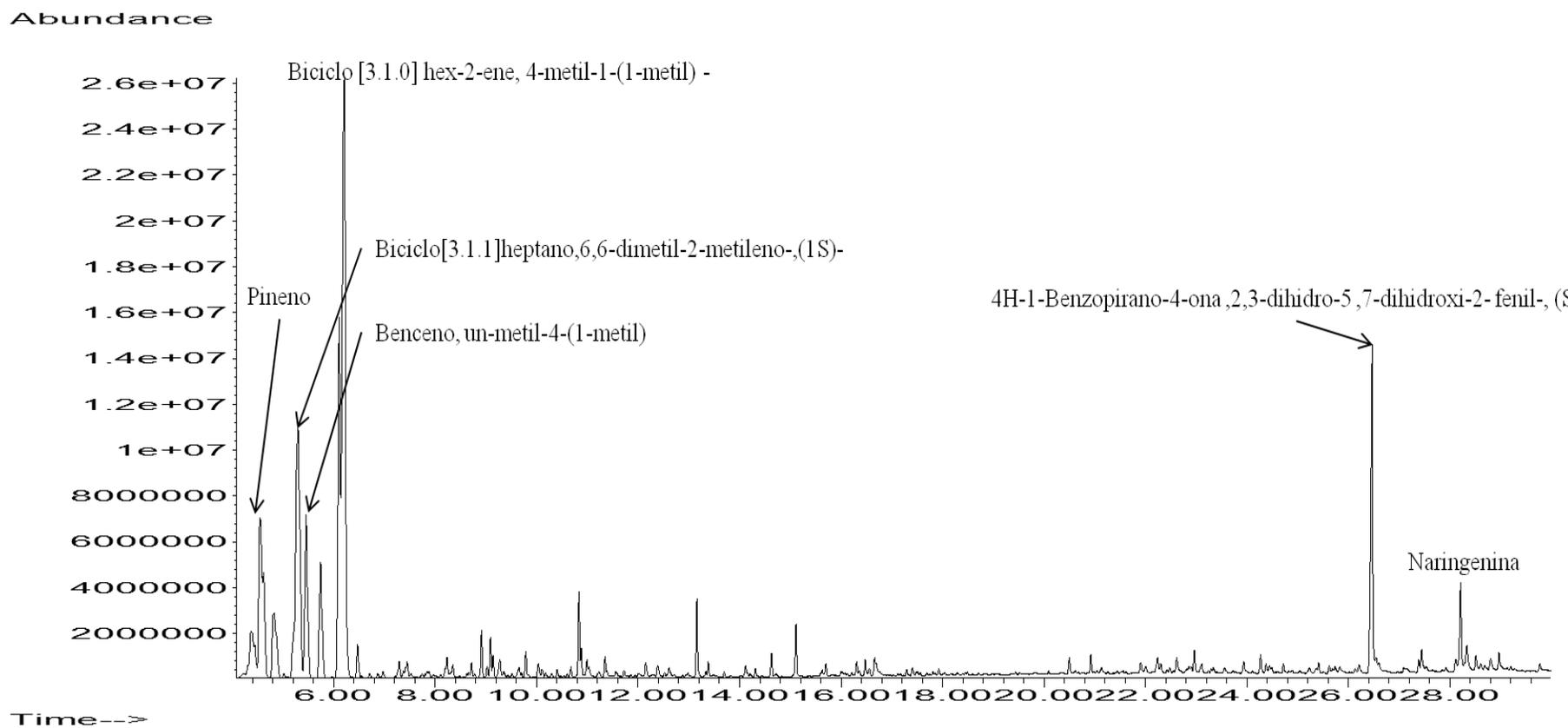


Figura 24 Cromatograma de gases del propóleo proveniente del municipio de Valle de Santiago, donde se muestran los nombres de los compuestos más abundantes.

VII. DISCUSIÓN

El objetivo de este trabajo fue el evaluar la actividad antibacteriana de propóleos de diferentes partes del país, frente a aislamientos de *Pasteurella multocida*, obtenidos de conejos con padecimientos respiratorios. Los propóleos provienen de Albino Zertuche municipio en el Estado de Puebla, del municipio de Tlacotalpan en Veracruz, de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán en el municipio de Cuautitlán Izcalli perteneciente al Estado de México, del municipio de San Juan del Rio en Querétaro y de Valle de Santiago municipio en el Estado de Guanajuato.

El propóleo con el mejor rendimiento al pasar de propóleo bruto a EEP fue el propóleo de Valle de Santiago, (Tabla 6) lo cual probablemente se deba a que fue el propóleo que se trabajó más rápidamente después de su colecta, esto debiéndose a que fue el último de los propóleos que se obtuvo, por lo cual también fue el que se trabajo más fresco.

Según las pruebas realizadas podemos determinar que los propóleos mexicanos presentan actividad antimicrobiana en contra de *Pasteurella multocida* y que esta actividad varía dependiendo del origen y la composición del propóleo.

En el experimento de sensibilidad, el efecto del propóleo, a las concentraciones probadas fue evidente contra el desarrollo de *Pasteurella multocida*, donde destaca la efectividad del propóleo obtenido en el municipio de San Juan del Rio, ya que este obtuvo una MIC ≥ 0.3 mg/ml. A este le siguen el producido en Valle de Santiago con una MIC de ≤ 0.6 mg/ml, y para el propóleo de la FES-C se obtuvo una MIC de 0.9 mg/ml. Incluso los extractos de Albino Zertuche y Tlacotalpan, que demostraron ser los menos eficientes tuvieron una inhibición parcial en contra de *Pasteurella* al utilizar las concentraciones más elevadas (0.9 mg/ml).

Estudios realizados con propóleos nacionales han demostrado actividad antimicótica en contra de las levaduras como *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans*, sobre el hongo filamentoso *Aspergillus fumigatus* así como actividad, frente a diversas bacterias;

Vibrio cholerae, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, reportadas con una MIC de < 0.125 mg/ml por Londoño *et al.*, en 2010 mientras que Martínez *et al.*, en el mismo año reportó una MIC de ≥ 0.45 mg/ml para *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella flexneri*, siendo esta la primera vez que se encontró dicha actividad en contra de *Pasteurella multocida* con una MIC ≥ 0.3 mg/ml. En cuanto a estos datos podemos ver que así como mencionan Boyanova *et al.*, en 2003 quien dice que el efecto del propóleo sobre microorganismos Gram negativos es limitada, Soforcin, en 1996 quien constató que inhibir el crecimiento de bacterias Gram negativas se requieren de concentraciones más elevadas que lo necesario para inhibir el crecimiento de los microorganismos Gram positivos. Katircioglu *et al.*, en 2006 por otro lado nos dice que tuvo una buena actividad de los propóleos turcos en contra de bacterias Gram negativas. Así podemos ver, que de los propóleos mexicanos también se requieren mayores concentraciones de propóleos para inhibir el crecimiento de las bacterias Gram negativas ya que para *Staphylococcus aureus* se requirió (bacteria Gram positiva de concentraciones < 0.125 mg/ml para los Gram negativos como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* etc. se requirieron concentraciones ≥ 0.45 mg/ml. Incluso en nuestro estudio las concentraciones fueron ≥ 0.3 mg/ml.

Conceição *et al.*, en el 2004 informó la sensibilidad *in vitro* de *Pasteurella multocida* aislada de conejos frente a extractos alcohólicos de propóleos colectados en São Paulo, Brasil, (empleando concentraciones de 5, 10 y 15%). Además este estudio realizado en el 2004 se determinó también la reducción en el número de unidades formadoras de colonia a nivel traqueobronquial en conejos al racionarles propóleo en el alimento, destacando que se requieren concentraciones mayores de propóleo a las necesarias para inhibir el crecimiento de las bacterias Gram positivas.

En el presente trabajo se encontró que los dos propóleos con mayor actividad el de San Juan del Rio y Valle de Santiago, tuvieron también la mayor cantidad de compuestos 42 y 48 respectivamente. Aunque al propóleo de Albino Zertuche también se le identificaron 42 componentes su actividad antibacteriana fue menor. Por lo cual es

importante considerar la concentración de flavonoides totales (Tabla 16). Gracias a esto se cree que podría existir una correlación entre el contenido de flavonoides en los propóleos y la actividad que estos presentan en contra de *Pasteurella multocida*.

Los principales flavonoides detectados fueron la pinocembrina, crisina y naringenina, los dos primeros considerados dentro de algunos de los componentes patrón de los propóleos europeos, y también se encuentra en los exudados de brotes de álamos (*Populus*) que se consideran como una de las principales fuentes de estos propóleos (Bankova *et al.*, 2002). También se han reportado en propóleo iraníes (Yaghoubi *et al.*, 2007). Además los valores de estos mismos compuestos se han visto variar en propóleos colectados en una misma área geográfica (Kosalec *et al.*, 2005).

La pinocembrina es uno de los flavonoides que se encuentra en altas concentraciones en los propóleos, cuyo origen botánico incluye a la familia de las leguminosas y las plantas de la especie *Dalbergia* (Lotti, *et al.*, 2010).

La crisina, derivado 2,3-dideshidro de la dihidrocrisina otro flavonoide importante encontrado, ha sido evaluado anteriormente en su actividad antimicrobiana, encontrado resultados positivos contra bacterias (Bylka *et al.*, 2004).

La flavanona naringenina ha sido reportada en los propóleos turcos por Katircioglu *et al.*, en 2006. También se han utilizado equivalentes de naringenina para lograr una estimación de los flavonoides por Kosalec *et al.*, en 2005, pues estos compuestos son considerados clave para llevar a cabo un control de la calidad de los productos realizados a base de propóleos. También se considera que ésta flavanona posee efecto bioactivo en la salud humana como antioxidante, anti-inflamatorio, promotor del metabolismo de carbohidratos y modulador del sistema inmunológico e investigaciones recientes indican que inhibe la secreción del virus de la hepatitis C en las células infectadas. Este bioflavonoide es de los más abundantes en los cítricos y es la flavanona predominante en las toronjas. (Infomed especialidades, 2010) Además, se han encontrado propiedades antibacterianas a este compuesto (Alibaba.com, 2010).

Kosalec *et al.*, en 2005 sugieren que el contenido de flavonoides en los productos elaborados a base de propóleos varían mucho, así mismo la actividad antimicrobiana hacia bacterias Gram-positivas como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* y *Enterococcus faecalis*, y la levadura *Candida albicans*. A las que solamente una solución de propóleo con menos del 1% de flavonoides totales no mostró actividad bactericida contra *S. pyogenes* y *E. faecalis*, a lo que concluye que probablemente se trate al bajo contenido de flavonoides.

Con respecto al perfil químico de los propóleos podemos determinar que la composición de cada uno difiere con respecto a su lugar de origen tal como se ha mencionado por otros autores (Bankova, 2005), también se puede considerar que la época de cosecha influye en la actividad antibacteriana ya que la variación de sólo un mes es suficiente para cambiar la actividad biológica e incluso la proporción de los constituyentes en el propóleo (Martínez *et al.*, 2010).

Se ha reportado que los propóleos pueden diferir en la actividad antimicrobiana en muestras del mismo apiario pero colectados en diferentes meses y tal efecto ha sido adjudicado a la composición de las resinas que lo forman, ya que las abejas extraen las resinas, principalmente de los puntos de crecimiento de las plantas lo cual varía dadas las condiciones medio ambientales de cada región geográfica. El mes de enero ha sido señalado en 2010 por Martínez *et al.*, quien analizó propóleos del Estado de Campeche - México e indicó que estos presentan mayor actividad antibacteriana contra bacterias Gram positivas y Gram negativas a diferencia de los propóleos colectados en el mes de diciembre de los mismos apiarios. Manrique, en el 2006 menciona que los propóleos colectados en el mes de enero en dos zonas diferentes del Estado de Miranda - Venezuela presentaron una mayor actividad antibacteriana, que la de los colectados en meses diferentes en estas mismas aéreas.

El propóleo de Tlacotalpan tuvo la actividad antibacteriana más baja, lo que puede deberse a que el único flavonoide que presenta es el 3',5-diacetoxi-3,3',7-trimetoxiflavona se encuentra en cantidades bajas ya que el contenido total de

flavonoides es de 1.474%. Por esto podemos pensar que el leve efecto que demostró contra *Pasteurella multocida* puede deberse al sinergismo con sus demás componentes, y no a este flavonoide en particular. Así mismo fue interesante observar que el componente más abundante con un 61.992% de este propóleo es el limoneno, y que es un compuesto que ya ha probado tener actividad antimicrobiana en contra de microorganismos Gram negativos y posiblemente se debe a este componente la actividad antimicrobiana que mostro este propóleo en particular (Delgado *et al.*, 2007). También, es importante señalar que este compuesto no está presente en los otros propóleos evaluados. Esto nos hace pensar que la actividad mostrada en contra de *Pasteurella multocida* por los propóleos de San Juan del Río y Valle de Santiago, que tuvieron una mayor actividad, se debe a los flavonoides que presentan y que son estos los que les confiere esa actividad.

VII. CONCLUSIONES

El objetivo del trabajo fue evaluar la actividad antibacteriana de cinco propóleos mexicanos, de diferente origen hacia *Pasteurella multocida* y correlacionar su composición química con la actividad antimicrobiana; de acuerdo a los resultados observados se puede concluir:

1. Se demostró actividad “*in vitro*” contra *Pasteurella multocida* provenientes de casos clínicos de neumonías de conejos, por los propóleos probados. Ya que no existen trabajos en México que demuestren actividad del propóleo en contra de *P. multocida* de conejos; se consideran a estos los primeros datos al respecto.
2. En cuanto el perfil químico se observó gran variabilidad de compuestos, detectados por cromatografía de gases, se pudieron contabilizar 33 compuestos para el propóleo de FES-Cuautitlán, 42 en el de Albino Zertuche, 48 en el de Valle de Santiago, 42 en el de San Juan del Río y 16 en el de Tlacotalpan.
3. Al parecer los flavonoides pinocembrina, crisina y naringenina, pueden considerarse, como los principales responsables de la actividad contra *Pasteurella multocida*, puesto que el contenido de éstos en los propóleos evaluados correlacionó con un efecto antibacteriano cuando su presencia fue significativa.
4. Aún hacen falta estudios “*in vivo*” en México, pero estos resultados alientan la posibilidad de utilizar el propóleo como un auxiliar en la prevención de *Pasteurella multocida* en conejos, como una alternativa natural y económica.
5. En este trabajo se analizó la actividad antimicrobiana y correlacionarla con los componentes químicos que constituyen a los propóleos evaluados, todos proceden de diferentes orígenes geográficos, donde factores como el clima, la

vegetación natural, las cuencas hidrográficas se modifican, pero debemos aclarar que: los propóleos probados de ninguna manera representan a la totalidad de los propóleos producidos en los diferentes municipios de la República, sino solamente representan una área geográfica muy específica que corresponden a las 5 zonas geográficas de donde proceden las muestras.

VIII. PERSPECTIVAS

Con todo lo expuesto anteriormente es importante continuar con esta investigación, la cual podría enfocarse en determinar el daño causado por el propóleo en las células bacterianas, y de ser posible establecer el mecanismo de acción en contra de *Pasteurella multocida*.

Llevar a cabo pruebas *in vivo*, bajo un modelo experimental donde se logre reproducir la pasteurelosis en conejos y de este modo probar la actividad antibacteriana del propóleo y sus efectos *in vivo*.

Todo esto encaminado a la elaboración de un producto a base de propóleo para el tratamiento o prevención de la pasteurelosis en conejos que pueda ser suministrado en el alimento o bien en el agua de bebida. Pensamos en esta posibilidad ya que se han realizado estudios en niños buscando reducir los padecimientos respiratorios con productos a base de hierbas que contienen extracto de equinácea propóleo y vitamina C, y se ha visto un efecto benéfico sobre la incidencia y severidad de las infecciones del tracto respiratorio en niños (Cohen *et al.*, 2004).

Realizar el montaje de las técnicas para detectar los flavonoides ya que el contenido de estos se relaciona directamente con la actividad antibacteriana. Cuyo objetivo sería buscar la presencia de pinocembrina, crisina y naringenina o bien que el contenido de flavonoides totales fuera de aproximadamente del 60% en los propóleos a utilizar para las formulaciones ya que de esta manera se piensa que tendría actividad contra la *Pasteurella multocida*.

IX. ANEXOS

Anexo 1 Preparación de Frotis

- ❖ Se colocó una pequeña gota de agua con el asa en el centro de un portaobjetos limpio.
- ❖ Se flameó el asa de siembra, se tomó, en condiciones asépticas una pequeña cantidad del cultivo bacteriano para transferirlo a la gota de agua homogeneizando, dejándolo secar (Londoño *et al.*, 2004).

Anexo 2 Tinción de Gram

Es una tinción diferencial que nos permite distinguir a bacterias Gram positivas y Gram negativas y nos permite también valorar la forma de las bacterias y agrupación:

- ❖ Sobre el frotis se colocó una gota de cristal violeta y se dejó transcurrir 1 minuto enjuagando con agua corriente.
- ❖ Se colocó una gota de lugol y se dejó transcurrir 1 minuto después del cual se decantó
- ❖ Se añadió alcohol acetona por 3 segundos para enjuagar con agua corriente.
- ❖ Se colocó una gota de safranina y se dejó reposar por 1 minuto antes de enjuagar.
- ❖ Se dejó secar y se observó al microscopio con el objetivo 100x y aceite de inmersión (Londoño *et al.*, 2004).

Anexo 3 Prueba de Catalasa

Esta nos permite determinar la capacidad de la bacteria para desdoblar el peróxido de hidrogeno en agua y oxigeno por medio de la enzima catalasa.

- ❖ Con un palillo estéril se transfirieron las bacterias del centro de una colonia a un portaobjetos limpio.
- ❖ Se agregaron 2 gotas de peróxido de hidrogeno al 3%, si después, de adicionar el reactivo se forman burbujas (efervescencia) el resultado es positivo. La ausencia de estas indica un resultado negativo (Londoño *et al.*, 2004).

Anexo 4 Prueba de Motilidad

Nos permite conocer si la bacteria presenta flagelos gracias a los cuales pueda desplazarse. A esta prueba *Pasteurella* es negativa

- ❖ Se tomó un cubreobjetos y se colocaron 4 bolitas de plastilina de 2 mm de diámetro en las esquinas.
- ❖ Fueron colocados 3 asadas de agua destilada estéril en el centro del cubreobjetos.
- ❖ Se adiciono una ligera asada de las bacterias, del centro de la colonia, a la gota y homogeneizar.
- ❖ Se voltea cuidadosamente la preparación colocándola sobre un portaobjetos.
- ❖ La laminilla se llevó al microscopio y se observo a 10 y 40 x.
- ❖ Se buscó con detenimiento: movimiento browniano, movimiento de corrientes, movimiento en todas direcciones.
- ❖ De ser positivo se debe percibir movimiento bacteriano en múltiples direcciones y de manera muy rápida en todo el campo microscópico (Londoño *et al.*, 2004).

Anexo 5 Prueba de Hialuronidasa

Nos permite conocer el tipo capsular A de *Pasteruella multocida*.

- ❖ En agar sangre se sembró la cepa de *P. multocida* a identificar.
- ❖ Se sembró una estría abundante en ángulo recto con respecto a las líneas de crecimiento de *P. multocida* a una bacteria que produce la enzima hialuronidasa en este caso se utilizo *Staphylococcus aureus*.
- ❖ Se incubaron por 24 horas a 37°C y se procedió a realizar la lectura.
- ❖ De tratarse del tipo capsular A las colonias perderán su cápsula y serán de un menor tamaño (Carter *et al.*, 1975).

Anexo 6 Prueba de Floculación con acriflavina

Nos permite conocer el tipo capsular D de *Pasteruella multocida*.

- ❖ En un tubo con 3 ml de caldo cerebro corazón, se inoculó a la *Pasteurella multocida* a partir de un cultivo fresco en agar sangre.
- ❖ Los tubos inoculados se incuban a 37°C durante 18 – 24 horas.
- ❖ Las bacterias se sedimentaron por centrifugación y se tomaron 2.5 ml del sobrenadante.
- ❖ Se añadió 0.5 ml de una solución acuosa 1/1.000 de acriflavina neutra.
- ❖ Se mezcló para resuspender el sedimento bacteriano y se incubó el tubo a temperatura ambiente, sin agitación.
- ❖ Se observó a los 5 minutos para detectar la presencia de un precipitado floculante abundante (Carter *et al.*, 1973).

Anexo 7 Otras pruebas que nos ayudan a la identificación de *Pasteurella multocida*.

En la Tabla 17 se muestran algunas de las características que nos ayudan a la identificación de *Pasteurella multocida*.

Tabla 17 Pruebas que ayudan a la identificación bacteriológica y los resultados esperados para *Pasteurella multocida* (Cowan, 1979).

Prueba	Resultado
Motilidad	-
Catalasa	+
Oxidasa	d
Crecimiento en agar MacConkey	-
Crecimiento favorecido por el CO ₂	.
Crecimiento en KCN	+
Carbohidratos, ácido de:	
Arabinosa	d
Lactosa	d
Maltosa	d
Manitol	+
Rafinosa	-
Salicín	-
Sorbitol	d
Sacarosa	+
Trehalosa	d
Xilosa	d
ONPG	d
Hidrolisis de la esculina	-
Reducción de nitratos	+
Reducción de nitritos	d
Indol	+
Hidrólisis de la gelatina	-
Ureasa	d
H ₂ S	-
Descarboxilasa de la ornitina	+

- + 85 – 100% de las cepas son positivas (por lo general, todas)
- 0 – 15 % de las cepas son positivas (no, en ninguna, algunas)
- d 16 – 84% de las cepas son positivas (en algunas)
- . No conocida

X. LITERATURA CITADA

ALIBABA.COM, Naringenin extract, http://www.alibaba.com/products/360854966/Naringenin_extract.html. Consultado 18 diciembre 2010.

BANKOVA V. Recent trends and important developments in propolis research. eCAM 2005; 2(1) 29–32 doi:10.1093/ecam/neh059

BANKOVA, V. POPOVA, M. BOGDANOV, S. SABATINI, GA. Chemical composition of European propolis: Expected and unexpected results. Z Naturforsch (C) 2002; 57: 530-533.

BEDASCARRASBURE E, MALDONADO L, FIERRO W, ÁLVAREZ A. Propóleos. 1ª edición. Edit. Ediciones MAGNA. Argentina. 2006, 28-66.

BEDASCARRASBURE E. <http://www.apinetla.com.ar/congreso/c13.pdf> Consultado 15 Mayo 2010.

BOTANICAL- ONLINE <http://www.botanical-online.com/propoleopropiedades.htm> Consultado 3 Marzo 2011.

BOYANOVA L, GERGOVA G, NIKOLOV R, DEREJIAN S, LAZAROVA E, KATSAROV N, et al., Inhibition of *Helicobacter pylori* growth in vitro by Bulgarian propolis: preliminary report. Journal of Medical Microbiology 2003, 52, 417–419.

BOYANOVA L, GERGOVA G, NIKOLOV R, DEREJIAN S, LAZAROVA E, KATSAROV N, et al., Activity of Bulgarian propolis against 94 *Helicobacter pylori* strains in vitro by agar-well diffusion, agar dilution and disc diffusion methods Journal of Medical Microbiology, 2005, 54, 481–483.

BOYCE JD, ADLER B. The capsule is a virulence determinant in the pathogenesis of *Pasteurella multocida* M1404 (B:2). Infect. Immun. 2000, 68, 3463-3468.

BOYCE JD, CHUNG, JY, ADLER, B. *Pasteurella multocida* capsule: composition, function and genetics. Journal of Biotechnology. 2000*, 83 153–160.

BYLKA, W, MATLAWASKA I, PILEWSKI NA. Natural flavonoids as antimicrobial agents. JANA. 2004,7(2) 24-31.

CARTER GR, RUNDELL S. Identification of type A strains of *P. multocida* using staphylococcal hyaluronidase. Vet. Rec. 1975; 96, 343.

- CARTER GR, SUBRONGO P.** Identification of type D strains of *Pasteurella multocida* with acriflavine. Am. J. Vet. Res. 1973; 34, 293–294.
- CARTER GR.** *Pasteurella* infection as sequelae to respiratory viral infections. J. Am. Vet. Med. Assn. 1973; 163, 863-864.
- CASTALDO S, CAPASSO F.** Propolis, an old remedy used in modern medicine. Fitoterapia, 2002, 73 Suppl. 1, S1-S6.
- COHEN H, VARSANO I, KAHAN E, SARRELL M.** Effectiveness of an herbal preparation containing echinacea, propolis and vitamin in preventing respiratory tract infections in children. Archives of Pediatric and Adolescent Medicine. 2004; 158: 217-221.
- COLOMBO T, ZAGO LG.** El conejo. Edit. De Vecchi. España. 2004, 142-134.
- CONCEIÇÃO R, EIELSON M, LANGONI H, CUNHA R.** Efeito do extrato alcoólico de própolis sobre *Pasteurella multocida* “in vitro” e em coelhos. Scientiarum. Animal Sciences Maringa. 2004; 26: 69-77.
- COWAN Y STEEL** Manual para la identificación de bacterias de importancia médica. 2ª edición. Edit. CECSA. México. 1979, 136-140.
- CUSHNIE TP, LAMB AJ.** Detection of galangin-induced cytoplasmic membrane damage in *Staphylococcus aureus* by measuring potassium loss. J Ethno pharmacol. 2005, 101(1-3):243-248.
- DAUGSCH A, MORAES C, FORT P, PARK YK.** Brazilian red propolis - chemical composition and botanical origin. eCAM 2008;5(4)435-441. doi:10.1093/ecam/nem057.
- DAY RA.** Química Analítica Cuantitativa. 5ª edición. Edit. Hispanoamérica México. 1989, 588-635.
- DE VECCHI E, DRAGO L.** Attività antimicrobica della propoli: cosa c'è di nuovo? Le Infezioni in Medicina, 2007, 1, 7-15.
- DEANGELIS PL, PADGETT-MCCUE AJ.** Identification and molecular cloning of a chondroitin synthase from *Pasteurella multocida* Type F. The journal of biological chemistry. 2000, 275(31):24124–24129.
- DELGADO HM, MARTÍNEZ L, CASILLAS PR, QUIJANO CE, LÓPEZ CJ, SAURI DE, et al.,** Identificación de los compuestos volátiles del propóleo

recolectados por *Apis mellifera* L. y *Melipona beecheii* B. en el Estado de Yucatán. Memorias del XXI seminario americano de apicultura. Julio 25-27 Mazatlán, Sinaloa. 2007, 127-133.

DZIVA F, MUHAIRWA AP, BISGAARD M, CRISTENSEN H. Diagnostic and typing options for investigating diseases associated with *Pasteurella multocida*. Veterinary Microbiology. 2008, 128: 1-22.

FARRÉ R, FRASQUET I, SÁNCHEZ A. El própolis y la salud. Ars pharmaceutica 2004, 45:1; 21-43.

FERNANDEZ JA, BALESTRIN E, BETONI J, OLIVERA O, DE SOUZA DA-C, MONTELLI AC. Propolis: anti-*Staphylococcus aureus* activity and synergism with antimicrobial drugs. Mem Inst Oswaldo Cruz.; 2005, 100: 563-566.

FOX MA. Química Orgánica 2ª edición. Editorial. Pearson Educación, 2000, 156-212.

GALAL A, EL-MOTAAL AM, AHMED. AMH, ZAKI TG. Productive Performance and Immune Response of Laying Hens as Affected by Dietary Propolis Supplementation. International Journal of Poultry Science. 2008, 7(3):272-278.

GARCÍA BN. Caracterización fenotípica y genética de aislados de *Pasteurella multocida* obtenidos de ganado porcino. (Tesis Doctoral) Madrid, España. Universidad Complutense De Madrid, 2010, 8-39.

GIRAL T, HUGUES B, SOTO CL. Suspensión oftálmica de propóleos-R: una alternativa en el tratamiento de las oftalmopatías en animales afectivos. RECVET. 2007, 2(9) <http://www.veterinaria.org/revistas/recvet/n090907/090702.pdf>

GÓMEZ. JL, ARACIL B, GIL Y. Comparación entre dilución en agar y otras 3 técnicas para la determinación de la sensibilidad de 228 aislamientos clínicos de bacilos gram-negativos no fermentadores. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica. 2009, 27: 331-337.

GONZALEZ R. Comunicación personal. Agosto 2010.

GUTIÉRREZ PJ, SMITH JE. Determinación de la presencia de ácido hialurónico en el material capsular de cepas de *Pasteurella multocida* tipos A y D aisladas de pulmones de cerdo. Veterinaria México, 1993, 24(2):113-116.

- HARRYS D.** Análisis Químico Cuantitativa. 2ª edición. Edit. Reverte S.A. España. 2001, 655-684.
- HEGAZI AG, EL-HADY FK.** Egyptian Propolis: 3. Antioxidant, Antimicrobial Activities and Chemical Composition of Propolis from Reclaimed Lands. Z. Naturforsch.(C) 2002; 57: 395-402.
- IMHOF M, LIPOVAC M, KURZ CH, BARTA J, VERHOEVEN HC, HUBER JC.** Propolis solution for the tratament of cronic vaginitis. International Journal of Gynecology & Obstetrics 2005; 89:127-132.
- INFOMED ESPECIALIDADES,** <http://www.sld.cu/sitios/mednat/temas.php?idv=20134>, Consultado 6 Diciembre 2010.
- KATIRCIOGLU H, MERCAN N.** Antimicrobial activity and chemical compositions of Turkish propolis from different regions. African Journal of Biotechnology; 2006, 5:1151-1153.
- KHOJASTEH S, SHIVAZAD M.** The effect of diet propolis supplementation on Ross broiler Chick performance. International Journal of Poultry Science, 2006, 5 (1):84-88.
- KONEMAN EW, STEPHEN DA, WILLIAMS MJ, SCHRENBERGER PG.** Diagnóstico Microbiológico. Edit. Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. 1999, 408-414.
- KOSALEC I, PEPELJNJAK S, BAKMAZ M, VAKDIMIR-KENELEVIC S.** Flavonoid analysis and antimicrobial activity of commercially available propolis products. Acta Pharm 2005; 55: 423-430.
- KULCSÁR G, FÁBIÁN K, FARSANG A, VIRÁG GY.** Evaluation of the protection provided by an inactivated trivalent *Pasteurella multocida* vaccine against experimental *Pasteurella* infection and pasteurellosis in commercial environment. Actas del 9th World Rabbit Congress. Jun 10-13, Verona,Italy, 2008, 987-991.
- LEHNINGER A, NELSON DL, COX MM.** Principios de bioquímica. 4ª edición. Omega, S.A. España. 2005
- LIST OF PROKARYOTIC NAMES WITH STANDING IN NOMENCLATURE,** <http://www.bacterio.cict.fr/> Consultado 21 Febrero 2011.

LONDOÑO AO, AVILA AJ, CANALES MM, HERNÁNDEZ DC, SERRANO P, FLORES OC, et al., Antibacterial comparative study extracts of Mexican propolis and of three plants which use *Apis mellifera* for its production. Journal of animal and veterinary advances, 2010, 9(8):1250-1254.

LONDOÑO O, QUINTERO M, NAVARRO M, HERNÁNDEZ, T GONZALEZ M, MUÑOZ G. Manual de microbiología general I, Edit. UNAM.2004, 50-53.

LONDOÑO OA, PENIERES JG, GARCÍA TC, CARRILLO L, QUINTERO MM, GARCÍA VS et al., Estudio de la actividad antifúngica de un extracto de propóleo de la abeja *Apis mellifera* proveniente del Estado de México. Tecnología en marcha. 2008, 21(1): 49-55.

LOTTI C, CAMPO FM, LISA PA, CUESTA RO, MARQUEZ HI, RASTRELLI L. Chemical constituents of red Mexican propolis. J. Agric. Food Chem., 2010, 58(4):2209–2213.

LOZANO JM. Origen de los problemas respiratorios. Revista Cunicultura; 2003,164: 245-251.

LOZINA LA, PEICHOTO ME, BOEHRINGER SI, KOSCINCZUK P, GRANERO GE, ACOSTA OC. Efficacy of Argentine propolis formulation for topical treatment of canine otitis externa. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 2010 62(6):1359-1366.

MANRIQUE A. Actividad antibacteriana de propóleos provenientes de dos zonas climáticas del Estado de Miranda, Venezuela. Efecto de La variación estacional. Zona tropical 2006, 24(1): 43-53.

MARTÍNEZ L, ROJAS N, ZETINA TR, CASILLAS PR. Propóleo oscuro del Estado de Campeche, México. Memorias del XXIV seminario americano de apicultura Julio 28-30 Cuernavaca, Morelos, 2010, 10-23.

MCMURRY J. Química Orgánica. 5ª edición. Edit. Internacional Tomson editores. España. 2001, 441-445.

MIRZOEVA OK, GRISHANIN RN, CALDER PC. Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. *Microbiol Res* 1997; 152(3):239-46.

- ÖZTÜRK H, PEKCAN M, SIRELI M, FIDANCI UR.** Effects of propolis on *in vitro* rumen microbial fermentation. Ankara Üniv Vet Fak Derg 2010, 57, 217-221.
- PARK Y, ALENCAR S, AGUIAR C.** Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. J. Agric. Food Chem., California, USA, 2002, 50 (9):2502-2506.
- PRESCOTT LM, HARLEY JP, KLEIN DA.** Microbiology. 6^{ta} edición. Edit. MacGraw-Hill. España. 2004, 547-550.
- QUINTERO ML, LONDOÑO OA, HERNÁNDEZ HF, MANZANO GP, LÓPEZ MR, SOTO ZC, et al.,** Efecto de extractos de propóleos mexicanos de *Apis mellifera* sobre el crecimiento *in vitro* de *Candida albicans*. Revista iberoamericana de micología. 2008; 25:46-50
- ROJAS N.** Variabilidad biológica de los propóleos de cuba. Actas del XXII Seminario Americano de Apicultura. Julio28-31 Mérida, Yucatán, 2008, 59-66.
- ROOT AI.** El ABC y YXZ de la apicultura. Enciclopedia de la cría científica y práctica de las abejas. Edit. Hemisferio sur S.A. Buenos Aires, Argentina, 1990, 596- 598.
- SHALMANY SK, SHIVAZAD M.** The effect of diet Propolis supplerment on Ross broiler chicks performance. International Journal of Poultry Science. 2006; 5:84-88.
- SKOOG DA, HOLLER J, NIEMAN T.** Principios de análisis instrumental 5^a edición. Edit. McGraw-Hill. España. 2000
- SOFORCIN, JM.** Efeito da sazonalidade sobre as propriedades imunomoduladora e antibacteriana da própolis e perfil bioquímico dos ratos. (Tesis Doctoral) Faculdade de Medicina Veterinaria e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu. 1996.
- TAKAISI KN, SCHILCHER H.** Electron Microscopic and Microcalorimetric Investigations of the Possible Mechanism of the Antibacterial Action of a Defined Propolis. Provenance. Planta Med. 1994, 60(3):222-227.
- THE ONLINE CHEMICAL BUYER`S GUIDE.** http://www.chemicalregister.com/5_7-DIHYDROXYFLAVANONE/Suppliers/pid221590.htm, Consultado 19 Diciembre 2010.

VELÁZQUEZ OV, ALFONSO FMU, MENDOZA BJ, TALAVERA RM, LAGUNAS BS, MONTES DE OCA JR. Efficacy of ciprofloxacin and enrofloxacin in the treatment of a respiratory pasteurellosis outbreak in new zealand rabbits. Actas 8th World Rabbit Congress. Sept 7-10. Puebla, México 2004, 658-662.

WILLARD H. Métodos instrumentales de análisis. Edit. Continental, S.A. de C.V. México. 1978, 492-527.

YAGHOUBI SMJ, GHORBANI GR, SOLEIMANIAN Z, SATARI R. Antimicrobial activity of Iranian propolis and its chemical composition. DARU. 2007, 15(1) 45-48