



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN

**EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL PROPÓLEO
SOBRE CEPAS DE *Staphylococcus aureus* AISLADAS DE CASOS DE MASTITIS
BOVINA.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

MEDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA:

BERENICE XOCHIQUETZAL PÉREZ TORRES

ASESOR: DR. TONATIUH A. CRUZ SÁNCHEZ

COASESORES: DRA. AMPARO LONDOÑO OROZCO

M. V. Z. RAFAEL PÉREZ GONZÁLEZ



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ
Jefa del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán**

Con base en el Art. 28 del Reglamento de Exámenes Profesionales nos permitimos comunicar a usted que revisamos **LA TESIS:**

Evaluación in vitro de la actividad antimicrobiana del propóleo sobre cepas de Staphylococcus aureus aisladas de casos de mastitis bovina.

Que presenta la pasante: **Berenice Xochiquetzal Pérez Torres**
Con número de cuenta: **40600045-7** para obtener el Título de: **Médica Veterinaria Zootecnista**

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

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU”
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 9 de Abril de 2012.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	MVZ. Susana Elvira García Vázquez	
VOCAL	Dr. Tonatiuh Alejandro Cruz Sánchez	
SECRETARIO	Dr. Antonio Gómez Alcántara	
1er SUPLENTE	MVZ. Patricia Gómez de la Cruz	
2do SUPLENTE	MVZ. Saúl Rodríguez Zamora	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 120).
HHA/pm

Este trabajo forma parte del proyecto DGAPA-PAPIIT IT223811: Perspectivas del uso del propóleo en la salud animal, y se brindó una beca por parte del mismo para llevarlo a cabo.

Fue realizado en las instalaciones del laboratorio de Microbiología (Lab. 6) de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campo IV, al igual que en el laboratorio de Microbiología Veterinaria, en la misma facultad.

Agradecimientos

A Dios, por darme la oportunidad de terminar esta profesión, y guiar mi camino por este sendero para poder descubrir mis capacidades. Por llenarme de bendiciones.

A mi papá y a mi mamá, por sus palabras de aliento para superarme siempre que me sentía derrotada; por su apoyo moral y económico sin exigir condición alguna, porque sin él no hubiera podido terminar mis estudios. Por todos sus consejos y todo su cariño y porque que nunca me han dejado sola en mi camino.

Adriana, Tona, gracias por apoyarme moralmente en cada situación que he pasado. Hermanos los quiero mucho, espero que este esfuerzo que he hecho les enseñe que las cosas no son imposibles, aunque cueste trabajo llegar a la cima, hay que dar nuestro mejor esfuerzo.

A mi pequeña Aiko Leilani, por ser el motivo más grande que tengo para salir adelante y poner siempre todo mi esfuerzo. Toño, gracias por estar en mi camino y ser parte de mi vida, por apoyarme en todas mis decisiones sin reproche alguno; ya veras que nos va a ir bien.

Dr. Tonatiuh y Dra. Amparo, gracias por darme la oportunidad de desarrollar una de las tantas ramas de esta carrera tan bonita y amplia. Gracias por dedicarme un poco de su tiempo, regalarme parte de sus conocimientos y de su experiencia; esperemos que esta investigación traiga muchos beneficios a la comunidad.

Al M.V.Z. Marco Antonio Mendoza y a todo el equipo del laboratorio de Microbiología, por su apoyo para realizar aislamientos e identificación bacteriana, y por la amistad que me brindaron desde que llegue a dicho lugar.

Magui, por ser como mi hermana y escucharme cuando lo necesite y lo seguiré necesitando, por hacerme reír siempre y darme consejos. Te quiero mucho amiga.

A todos mis amigos, por apoyarme siempre de alguna manera, por hacerme divertido y agradable el camino del estudio.

Índice

1. Resumen	11
2. Introducción	12
2.1 Mastitis	12
2.2 Mastitis aguda	13
2.3 Mastitis crónica	14
2.4 Mastitis estafilocócica	14
2.4.1 Patogenia	16
2.4.2 Signos clínicos	18
2.4.3 Diagnóstico	19
2.4.4 Tratamiento	22
2.5 Apiterapia	22
2.5.1 Propóleo	23
3. Objetivos	28
4. Hipótesis	28
5. Diseño experimental	29
6. Materiales y Métodos	30
6.1 Propóleos	30
6.2 Preparación del extracto etanólico número 1 (FESC)	30

6.3 Microorganismos	31
6.4 Prueba cuantitativa de sensibilidad	31
7 Resultados	33
7.1 Resultados estadísticos	41
7.2 Panorama general	49
8 Discusión	50
9 Perspectivas	51
10 Conclusiones	52
11 Bibliografía	53

Índice de figuras

Figura 1. Ubre con mastitis	12
Figura 2. . <i>Staphylococcus aureus</i> observado con Tinción de Gram	15
Figura 3. Pezón con mastitis gangrenosa	17
Figura 4. Prueba de California	21
Figura 5. Propóleo en greña	23
Figura 6. Abeja (<i>Apis mellifera</i>) recolectando propóleo	24
Figura 7. Técnica de punteo	32
Figura 8. Diagrama donde se muestra el orden de sembrado de las cepas	32
Figura 9. Prueba de dilución en agar del propóleo 1(FESC)	34
Figura 10. Prueba de dilución en agar del propóleo 2	36
Figura 11. Prueba de dilución en agar del propóleo 3	38
Figura 12. Prueba de dilución en agar del propóleo 4	40
Figura 13. Prueba de dilución en agar del propóleo 5	41

Índice de tablas.

Tabla 1. Rango de células para la escala de la prueba de California para mastitis.	20
Tabla 2. Resultados de las pruebas de identificación primaria y de la prueba de coagulasa.	31
Tabla 3. Resultados de la prueba de dilución en agar del propóleo 1 (FESC).	33
Tabla 4. Resultados de la prueba de dilución en agar del propóleo 2.	35
Tabla 5. Resultados de la prueba de dilución en agar del propóleo 3.	37
Tabla 6. Resultados de la prueba de dilución en agar del propóleo 4 y 5.	39
Tabla 7. Porcentaje de efectividad de los 5 propóleos	49

Índice de gráficas.

Gráfica 1. Comparación de los porcentajes de inhibición en la concentración 3 mg/ml.	42
Gráfica 2. Comparación de los porcentajes de inhibición en la concentración 2.5 mg/ml.	43
Gráfica 3. Comparación de los porcentajes de inhibición en la concentración 2.0 mg/ml.	44
Gráfica 4. Comparación de los porcentajes de inhibición en la concentración 1.5 mg/ml.	45
Gráfica 5. Comparación de los porcentajes de inhibición en la concentración 1.0 mg/ml.	46
Gráfica 6. Comparación de los porcentajes de inhibición en la concentración 0.5 mg/ml.	47
Gráfica 7. Comparación de los porcentajes de inhibición en la concentración 0.25 mg/ml.	48
Gráfica 8. Porcentaje de efectividad de los 5 propóleos.	49

1 RESUMEN

La mastitis, es una enfermedad multifactorial que afecta de manera muy importante la economía mundial de los hatos lecheros. Esta enfermedad se da por varias causas, una de ellas es la infección por microorganismos, principalmente bacterias. Dentro de las tantas clasificaciones en donde se agrupa esta enfermedad, encontramos que la mastitis causada por el microorganismo *Staphylococcus aureus* se encuentra en el grupo de las mastitis infecciosas, y provoca mastitis subclínicas, lo que la hacen aún más peligrosa para los hatos, ya que la pérdida económica por estas mastitis es muy alta. Los tratamientos convencionales para esta enfermedad, no dan buenos resultados, por lo que debemos pensar en tratamientos alternativos naturales.

El uso del propóleo, que es un producto de la colmena, se ha tomado muy en serio actualmente, ya que es una resina que tiene una gran variedad de propiedades, dentro de las más importantes se encuentran su actividad antimicrobiana, antifúngica y antiviral. Estas propiedades están dadas por la mezcla de una gran variedad de compuestos, dentro de los cuales destacan los flavonoides.

En este trabajo se evaluó el efecto antimicrobiano de cinco propóleos, cuatro de ellos comerciales, y uno perteneciente al apiario de la FESC, en contra de diez cepas de *Staphylococcus aureus*, aisladas de casos de mastitis bovina. Se utilizó la técnica de punteo para sembrar a las bacterias, en cajas de Petri, con 6 ml de medio (Mueller-Hinton) cada una.

Las concentraciones utilizadas van desde 0.125 mg/ml hasta 3 mg/ml para cada propóleo evaluado. La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los cinco propóleos, varían notablemente; se encontró una CMI de 0.5 mg/ml para el propóleo de la FESC, mientras que los demás van desde 1 mg/ml hasta >3 mg/ml. La cepa número 3 fue la más resistente en los propóleos 2 y 3, ya que logró crecer hasta nuestra concentración más alta (3 mg/ml). En los propóleos 4 y 5 no se obtuvo ningún efecto de inhibición.

Podemos concluir que no todos los propóleos comercializados, tienen actividad bactericida contra esta bacteria, y muy probablemente tampoco contra otras. La calidad de los propóleos comerciales no es constante, y es necesario buscar un estándar de calidad para el mismo.

2 INTRODUCCIÓN

2.1 Mastitis

A pesar de las nuevas generaciones de antibióticos, la mastitis bovina sigue siendo uno de los principales problemas en las explotaciones dedicadas a la industria de la leche.

La mastitis es considerada la enfermedad infecciosa más costosa de las vacas lecheras, debido a que induce a una disminución en la producción del 4 al 30% de leche y baja su calidad, además de incrementar los costos del cuidado de la salud del hato y un desecho prematuro de animales genéticamente mejorados.^{1-2,31}

La mastitis, es la inflamación del parénquima de la glándula mamaria, independientemente de su causa. Este proceso se caracteriza por varios cambios físicos y químicos en la leche, y por alteraciones patológicas en el tejido glandular. Los cambios más importantes que se producen en la leche incluyen la modificación del color, presencia de coágulos y un gran número de leucocitos. Estas manifestaciones pueden pasar inadvertidas, o pueden presentarse de manera muy severa, además, se pueden presentar de manera subclínica, o pueden llegar hasta la toxemia o gangrena; todo depende de la severidad con la que reaccione la glándula mamaria a la fuente de irritación.^{1,3-5}



Fig. 1 Ubre con mastitis. se puede observar la gran inflamación de la misma. Tomada de: <http://agroproduccionenline.blogspot.com/> Dic. 2011

Hay diversas causas que provocan la inflamación de la glándula, las principales causas son las de origen bacteriano (la mayoría de estas infecciones, se deben a *Streptococcus agalactiae*, otros estreptococos y *S. aureus*.)^{6,7}. Menos frecuente se presenta por hongos filamentosos y levaduriformes, además de traumatismos, lesiones e irritaciones de origen químico. La puerta de entrada de la mayoría de las infecciones está en el orificio del pezón y en el canal.^{5,9}

Dependiendo de esto, la mastitis se puede dividir en: mastitis aguda y mastitis crónica, además de otras clasificaciones, por ejemplo: mastitis contagiosas y mastitis ambientales.

2.2 Mastitis aguda

Generalmente es el resultado de una infección reciente, o bien puede ser una reactivación de una mastitis crónica. Puede ocurrir en cualquier momento, pero es más frecuente después del parto; esto se debe a la entrada de alguna bacteria y al daño que provoca en el pezón o la misma ubre; también puede ocurrir una inoculación a la glándula, mientras se lleva a cabo una terapia intramamaria o alguna cirugía del pezón, e incluso de infecciones sistémicas, aunque esto último es muy raro.^{5,6}

Los signos que se presentan son:

- ✓ enrojecimiento
- ✓ hinchazón
- ✓ endurecimiento y aumento de la sensibilidad del cuarto afectado
- ✓ aumento de la temperatura rectal
- ✓ anorexia
- ✓ disminución de la función ruminal
- ✓ debilidad
- ✓ depresión

El aspecto de la leche se ve severamente alterado, puede apreciarse una secreción purulenta, serosa o sanguinolenta. La producción se disminuye drásticamente.⁵

2.3 Mastitis Crónica

No hay una división clara entre la mastitis aguda y la crónica; algunos agravantes agudos pueden ocurrir en los casos crónicos, y las mastitis agudas pueden persistir lo suficiente como para llegar a convertirse en crónicas. Las mastitis crónicas a menudo están acompañadas de endurecimientos de la región de la cisterna de la glándula. La característica más común es la aparición intermitente o continua de chorros acuosos, coágulos, redcillas de fibrina en los primeros chorros de leche.^{5,6}

Otra forma para clasificar a las mastitis es dependiendo del agente etiológico, de esta manera, encontramos a la mastitis contagiosa, que se transmite de un cuarto infectado a otro; y a la mastitis ambiental, que generalmente están presentes en el entorno del animal y alcanzan el pezón desde él. A continuación nos enfocaremos a una de las mastitis que más causa problemas en los hatos de todo el mundo, la mastitis estafilocócica.

2.4 Mastitis estafilocócica

Es la inflamación de la glándula mamaria ocasionada por *S. aureus*.

El *S. aureus* es una bacteria patógena que pertenece a la familia Micrococacceae. Al realizar la tinción de Gram, se observan cocos morados (Gram positivos) que se agrupan en forma de racimo de uva; es de metabolismo aerobio y anaerobio facultativo, no presenta movilidad, ni esporas, produce catalasa y en la prueba de coagulasa, se observa la formación de un coagulo de fibrina en el fondo del tubo, además, crece rápidamente en agar sangre. Sus colonias miden de 1 a 3 mm y se observan de color grisáceo o dorado, además produce beta hemólisis. Tiene metabolismo fermentativo. Puede crecer en medios salinos y produce fermentación láctica.^{14, 32}

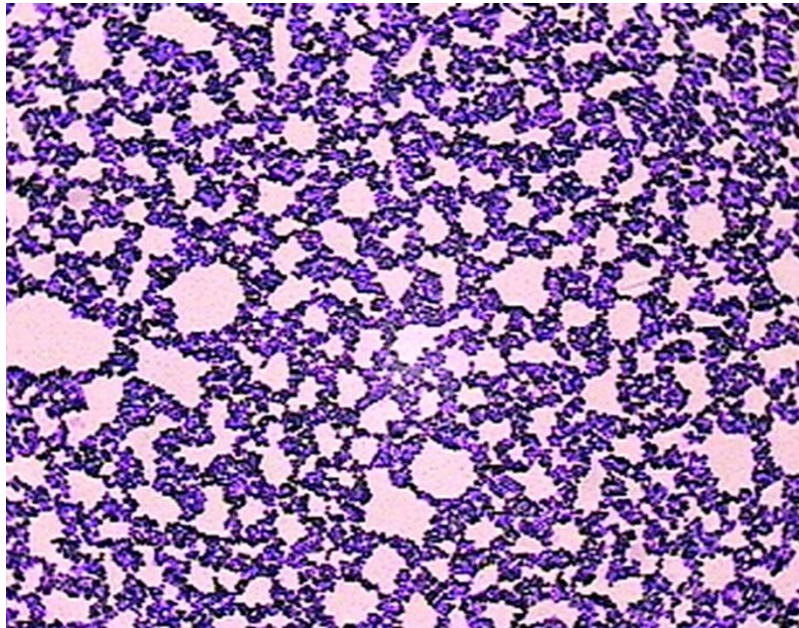


Fig.2. *Staphylococcus aureus* observado con Tinción de Gram. (Cortesía del laboratorio 6 de Microbiología de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán-Universidad Nacional Autónoma de México. Septiembre 2011).

Esta bacteria posee tres grupos de factores de virulencia, los cuales son:

- Componentes de superficie. Su cápsula, la capa externa, y la capa interna poseen propiedades antifagocíticas.
- Exotoxinas. Dentro de este grupo podemos encontrar hemolisinas como la alfa, beta, delta y épsilon. Además también producen leucotoxinas. Su función principal es degradar los tejidos locales del huésped para convertirlos en nutrientes para la bacteria.
- Enzimas extracelulares. Tal es el ejemplo de la coagulasa, hialuronidasa, nucleasas, fibrinolisisina, lipasas, esterasas y lisozima.

La coagulasa es una prueba especial para separar a los diferentes *Staphylococcus*, dividiéndolos en dos grandes grupos: coagulasa positivos y coagulasa negativos, esto en función de su capacidad de coagular el plasma. Los coagulasa positivos

normalmente se consideran patógenos cuando se aíslan de una lesión (*S. aureus*), mientras que los coagulasa negativos son considerados no patógenos.^{14, 15, 32}

Los factores de virulencia asociados con la pared celular incluyen los receptores de superficie con propiedades enlazantes para inmunoglobulinas, fibrinógenos, fibronectina, colágeno y otras proteínas externas. Las proteínas extracelulares secretadas por esta bacteria comprenden, entre otras, la variedad de enterotoxinas estafilocócicas conocidas como enterotoxinas estafilocócicas (SE) de la A la Q; las toxinas exfoliativas A (ETA) y B (ETB); una toxina del síndrome de choque tóxico (TSST-1) y una exotoxina similar nueva en el grupo (SET 1-11). Estos factores de virulencia facilitan la diseminación horizontal de las poblaciones de *S. aureus*.^{15, 32}

La mastitis causada por *S. aureus* es una mastitis contagiosa. Su prevalencia varía del 7 al 40%, y en algunos rebaños, puede ser superior. Es la especie identificada más común en las mastitis subclínicas; sin embargo en muchos casos, el nivel de infección en el hato puede estar muy elevado, lo que provoca mastitis clínicas. Las infecciones intramamarias por este agente, ocurren raramente antes del parto, pero aumentan durante la primera semana del puerperio.^{5,6,9}

Esta bacteria puede presentar un riesgo en el consumidor, debido a la capacidad del microorganismo de producir enterotoxinas, y la toxina del síndrome del shock tóxico (TSST-1), que causa una intoxicación alimentaria grave. Sin embargo, la leche de vacas con mastitis no constituye un riesgo importante en la intoxicación alimentaria por la enterotoxina de *S. aureus*.^{5, 33}

2.4.1 Patogenia

La infección en el comienzo de la lactación puede causar una forma sobreguada de mastitis, con gangrena de la ubre. Durante las últimas fases de la lactación o durante el

periodo seco, las nuevas infecciones no suelen acompañarse de una reacción sistémica, sino que provocan una forma aguda o crónica.^{5,9,33}

En la forma gangrenosa, la muerte del tejido se precipita por la trombosis de las venas, causando edema local y congestión de la ubre. Los estafilococos son las únicas bacterias que producen normalmente esta reacción en la ubre de la vaca; la toxemia resultante se debe a las toxinas bacterianas y a la destrucción tisular.⁵



Fig.3 Pezón con mastitis gangrenosa. Tomada de: <http://handresen.perulactea.com/2008/08/05/capitulo-3-mastitis-addendum/>. Enero 2012.

Puede haber invasión secundaria por *E. coli* y algunas especies de *Clostridium*, que además de agravar las lesiones, producen gas.⁵

En la mastitis aguda y crónica, la patogenia es la misma, lo que las distingue es el grado de compromiso del tejido mamario. En las dos formas, cada foco comienza con una fase aguda, que se caracteriza por la proliferación de las bacterias en los conductos galactóforos y, en menor grado, los alveolos.^{5,6}

Cuando la mastitis es aguda, los conductos pequeños se bloquean rápidamente por coágulos de fibrina, causando un compromiso más grave del área obstruida.

En la forma crónica, son menos los focos de inflamación y la reacción es más leve; esta inflamación está limitada al epitelio de los conductos. Estos signos no son muy evidentes, y a los pocos días se sustituyen con la proliferación de tejido conjuntivo alrededor de los conductos, lo que provoca obstrucción y atrofia del área drenada.^{5,6}

Una característica de la mastitis estafilocócica crónica importante para el diagnóstico, es la eliminación cíclica de las bacterias del cuarto afectado. También se observa el aumento y disminución de células polimorfonucleares en la leche y su capacidad para fagocitar bacterias.^{2, 3-5, 31}

2.4.2 Signos clínicos

La Mastitis estafilocócica crónica es la más común, también es conocida como mastitis subclínica, y las pérdidas más importantes están causadas por esta forma. El 50% del hato puede estar afectado, y solo algunos pocos animales presentan anomalías que el ordeñador puede reconocer.^{2, 3-5, 31}

Se puede presentar la aparición de coágulos en la leche o aspecto acuoso en los primeros chorros. El recuento celular aumenta, pero la enfermedad puede pasar desapercibida hasta que se pierde gran parte de la funcionalidad de la glándula. La infección puede perdurar y progresar en varios meses.^{5,6}

Las mastitis agudas y fulminantes son muy poco frecuentes, pero pueden ocurrir. En la primera se produce hinchazón intensa de la glándula y la leche es purulenta o contiene muchos coágulos gruesos. Puede presentarse fibrosis extensa y una pérdida importante de la función. Ocurre con mayor frecuencia al comienzo de la lactación.^{5,9}

La mastitis fulminante se produce en los primeros días posteriores al parto y es muy letal. Se presenta una reacción sistémica intensa con un aumento en la temperatura a 41-42°, la

frecuencia cardiaca va de 100-120 lpm, anorexia, depresión, ausencia de movimientos ruminales, y debilidad muscular, esta última puede ser tanta, que el animal permanezca en decúbito. El inicio de estos signos es repentino. El cuarto afectado esta hinchado, duro y es muy doloroso a la palpación, esto puede provocar cojera en el lado afectado.⁵

2.4.3 Diagnóstico

Se pueden utilizar varias técnicas para la confirmación de esta enfermedad. A continuación se enlistan las más comunes.^{9, 33, 34}

- Cultivo de la leche de las vacas. Este es el mejor método para identificar a los animales con infección por *Staphylococcus aureus*.
- Cultivo de la leche del tanque de recolección. Se necesitan 0.3 ml de la leche del tanque, y se requiere de un medio especial: Baird-Parker.
- ELISA. El método directo de ELISA mide el aumento de los antígenos granulocíticos polimorfonucleares, proporciona también una estimación precisa de recuentos celulares en leche tan bajos como de 100 000/ml.
- Recuento de células somáticas. Un recuento de más de 500 000 células/ml de leche se considera indicativo de inflamación. La prueba de California puede utilizarse para identificar los cuartos de los que se deben obtener muestras de leche para su cultivo.

La prueba de California para mastitis (CMT), es una prueba biológica que nos da una indicación si el recuento de células somáticas es elevado o bajo, por lo que todo resultado por encima de una reacción vestigial se considera sospechoso. Es la más utilizada en campo para el diagnóstico de la mastitis.⁹

Pasos a seguir para la realización de la Prueba de California para Mastitis:

1. Se desecha la leche del pre ordeño.
2. Se ordeñan uno o dos chorros de leche de cada cuarto en cada una de las placas de la paleta.
3. Se inclina la paleta de modo que se desecha la mayor parte de esta leche.
4. Se añade a la leche un volumen igual de reactivo.
5. Se mezcla el reactivo y se examina en cuanto a la presencia de una reacción que va desde trazas, hasta la gelificación. Antes de continuar con la vaca siguiente se debe enjuagar la placa.

Los resultados pueden ser interpretados en cinco clases: desde el resultado negativo en el que la leche y el reactivo siguen siendo acuosos, hasta el recuento de células más elevado en el que la mezcla de la leche y el reactivo casi se solidifica. Esto se determina en relación a la reacción de gelificación.^{9,33}

Escala de CMT	Rango relativo de células somáticas cs/ml	Criterio
NEGATIVO	< 200,000	La leche aún se observa acuosa
TRAZAS	150, 000 - 500, 000	Se forma un precipitado en el fondo del pozo, pero desaparece pronto.
1	400, 000 - 1, 500 000	Hay mayor precipitado, pero no se forma gel.
2	800, 000 - 5, 000 000	El precipitado se vuelve denso y se queda en el centro.
3	> 5, 000 000	Se forma un gel denso que se pega en la paleta.

Tabla 1. Rango de células dependiendo de la escala de la prueba de mastitis. (Bedolla 2007).

La prueba consiste en el agregado de un detergente a la leche, el alquilauril sulfonato de sodio, causando la liberación del ADN de los leucocitos presentes en la ubre y este se convierte en combinación con agentes proteicos de la leche en una gelatina.⁹

A mayor presencia de células se libera una mayor concentración de ADN, por lo tanto mayor será la formación de la gelatina, traduciéndose en nuestra lectura e interpretación del resultado como el grado más elevado de inflamación.⁹

Es decir, permite determinar la respuesta inflamatoria con base en la viscosidad del gel que se forma al mezclar el reactivo (púrpura de bromocresol más el alquilauril sulfonato de sodio) con la misma cantidad de leche en una paleta con cuatro pozos independientes permitiendo evaluar cada cuarto independientemente.⁹



Fig. 4 **Prueba de California.** En esta paleta para la prueba de California, se observa en el pozo superior izquierdo la viscosidad de la leche más marcada que en el pozo inferior, lo que correspondería a una mastitis subclínica grado 2. Los pozos de la derecha permanecen acuosos y sin cambio, por lo que no hay mastitis. (Pérez, 2010.)

Sin embargo, esta prueba es subjetiva y tiene que hacerse al lado de la vaca durante el ordeño (lo que interfiere con el manejo del ordeño).

La Prueba de California es un método de diagnóstico que posee una sensibilidad del 97% y una especificidad del 93%.^{9, 34}

2.4.4 Tratamiento

El porcentaje de curación de la mastitis por *S. aureus* con infusiones intramamarias, o la administración parenteral de antibióticos son muy poco satisfactorias, especialmente en las vacas en lactación. Las tasas de curación después del tratamiento apenas supera el 50% y las infecciones frecuentemente persisten a lo largo de la vida de la vaca.^{10-10, 35}

Se han usado muchos fármacos para su tratamiento, y como siempre ocurre en las enfermedades multifactoriales, éstos cambian con el tiempo y deben revisarse periódicamente,^{14, 15, 28} y no se han creado métodos adecuados para la erradicación de mastitis estafilocócica en las vacas infectadas, además con la presencia de levaduras, el tratamiento antibacteriano no funciona.¹²

Debido también, al abuso del uso de diferentes antibióticos, se deben empezar a buscar alternativas médicas naturales para el control de esta enfermedad.

2. 5 Apiterapia

Dentro de la medicina alternativa, la apiterapia, es un área que está llegando a su auge en esta época. Se le reconoce como disciplina médica que emplea los productos derivados de la colmena: miel, propóleo, polen, jalea real y apitoxina en el tratamiento y la prevención de enfermedades.

2.5.1 Propóleo

El propóleo es una sustancia resinosa, gomosa, de consistencia viscosa y presenta diferentes colores, desde verde pardo, rojo, castaño, e incluso casi negro, dependiendo de su origen botánico. Su sabor es frecuentemente amargo.^{1, 2, 12} Esta palabra proviene del griego pro (antes) y polis (ciudad), esto se traduce como "defensas antes de la ciudad" o "defensor de la ciudad".²³



Fig. 5 Propóleo en greña. Tomado

de <http://www.moonmentum.com/blog/pronostico/cocinando-con-los-dioses/el-mana-nos-brinda-leche-y-miel/>. Consultado en diciembre 2011.

Este producto es colectado por las abejas (*Apis mellifera*) de partes de plantas, capullos y exudados. Las abejas lo utilizan con diversos fines:^{16, 21-23, 37, 38}

- Como sellador de sus colmenas para evitar la entrada del frío en el invierno, y de calor en el verano, así como la entrada de depredadores y visitas indeseadas.
- Para prevenir la descomposición de criaturas que han sido muertas por ellas mismas después de una invasión a la colmena.
- Para tapar grietas o quebraduras del lugar que alberga a la familia.
- Para fijar los panales verticales.

Es por esta, y otras propiedades, que el propóleo ha comenzado a ser estudiado y utilizado como alternativa para tratar enfermedades tanto de personas como de animales, en las cuales, el agente etiológico ha sido eliminado por este producto de la colmena.

Las abejas encargadas de la recolección del propóleos lo hacen durante las horas más cálidas del día, entre las diez de la mañana y las tres de la tarde, aprovechan altas temperaturas para facilitar la recolección. La obtención de esta resina tiende a ser muy dura y friable en ausencia de calor, pero a temperaturas de más de veinte grados, se vuelve muy maleable; se funde alrededor de los sesenta y cinco grados.²¹

El proceso de recolección se da mediante un proceso de bioselección. Las antenas de las abejas detectan la fuente vegetal, después desprenden la resina con sus mandíbulas y la secreción de sus glándulas salivales, y maniobran con sus patas hasta colocarla en los cestillos de sus extremidades posteriores. Las abejas encargadas de recolectar el propóleos son llamadas pecoreadoras.^{21, 23}



Fig. 6 Abeja (*Apis mellifera*) recolectando propóleo. Apicultura sin fronteras. http://www.todomiell.net/notas/apiterapias/articulo_apiterapias.php?get_notas_id=1273&get_notas_titulo=Los-Productos-de-la-COLMENA-en-la-APITERAPIA. Octubre 2009.

En la composición general del propóleo encontramos: ceras, resinas, bálsamos, aceites aromáticos, polen y otras materias orgánicas. La proporción de estas sustancias varía y depende del lugar y tiempo de la recolección.^{16, 21, 38}

Químicamente esta compuesto por:

- aminoácidos
- ácidos alifáticos y sus esteres
- ácidos aromáticos y sus esteres (benzoico, cinámico, cafeico, cumárico, ferúlico);
- alcoholes
- aldehídos
- cetonas
- hidrocarburos, (no tienen acciones biológicas importantes);
- flavonas (pinostrobin, pinocembrina, naringenina, etc.); flavononas (tectocricina, crisina, apigenina, etc.);
- terpenoides y otros compuestos como cimeno, limoneno, estireno.¹

La calidad del propóleo varia en cuanto a las sustancias antes mencionadas, dependiendo de la zona geográfica de recolección, condiciones climáticas, al estado de la colmena, y también a la alimentación de la misma.

Los componentes del propóleo como las flavonas, flavononas y terpenoides principalmente, le proporcionan a este compuesto resinoso una actividad antimicrobiana

y antifúngica natural, sin embargo no son las únicas propiedades que tiene, a continuación se mencionan estas y otras propiedades de este compuesto:^{23, 25- 30, 39- 42}

➤ Antimicrobiana

Los componentes fundamentales para esta propiedad son los ácidos oxibenzoico, metoxibenzoico, cafeico y ferúlico, los sesquiterpenos y las flavonas. La actividad antimicrobiana de los extractos de propóleo debe evaluarse estableciendo la CMI y la Concentración Mínima Bactericida (CMB), la relación entre ambas concentraciones es importante ya que, mientras más cercana sea la relación 1:1, más útil es el extracto para propósitos terapéuticos.

El mayor efecto antibacteriano se observa frente a gérmenes Gram positivos como el *Staphylococcus aureus*, incluso en cepas Meticilino Resistentes (SAMR). También muestra susceptibilidad el estreptococo beta hemolítico, que es responsable en muchas ocasiones de amigdalitis pultácea, impétigo y de erisipela, entre otras infecciones.²¹

Muchas bacterias Gram negativas también son susceptibles, entre las que se encuentran algunas cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Proteus spp.* y *Corynebacterium pseudotuberculosis*.

➤ Antimicótica

Se considera que los sesquiterpenos, sobre todo el bisalbolol y las flavonas (pinocembrina) son los principales compuestos responsables de esta actividad. La actividad antimicótica se ha observado en hongos filamentosos y levaduriformes. En un estudio en el Estado de México, se encontró que a una concentración de 0.8 mg/ml de un extracto etanólico de propóleo, se presentó una inhibición del 94.4% de aislamientos de *Candida albicans*.¹⁹

➤ Antiviral

Los componentes de naturaleza flavonoides, revelan una actividad antiviral bien definida. En 1975 estudiaron el efecto inhibitorio de una solución de propóleo de 10% frente a tres

especies de virus de plantas, y se obtuvo como resultado que el virus de la necrosis del tabaco fue el más sensible.^{19, 21}

En 1976, se demostró que una mezcla de propóleos ensayada a concentraciones de menos del 1% disminuyó el título infectante del Virus del Herpes Simple *in vitro*.

➤ Antiparasitario

Esta actividad se ha probado exitosamente frente al protozoo *Giardia lamblia*. Su efecto anti-giardiasis se produjo en tan solo 24 hrs., en un aislamiento de laboratorio; además se observó también la inhibición del crecimiento, y la aparición de un gran número de parásitos redondeados e inmóviles, signo de su muerte.¹⁹

➤ Antiinflamatorio, cicatrizante y anestésico

Esta actividad se relaciona principalmente con los glucósidos que aparecen en el propóleo en forma de agluconas libres. Se considera que su mecanismo de acción se basa en la intervención de estos compuestos a nivel de mediadores de la inflamación. Los preparados a base de propóleo tienen la capacidad de acelerar la epitelización y la división celular en la curación de heridas; además de prevenir y detener el desarrollo de procesos inflamatorios.

La acción anestésica del propóleo resulta superior a la de anestésicos como la novocaína, gracias a los elementos volátiles que contiene, tales como eugenol, isoeugenol y metileugenol.

Los estudios de Strehl *et al.* (1993) revelan que uno de los mecanismos de acción, puede relacionarse con la inhibición de la enzima hidrofolato reductasa, posiblemente mediante el ácido cafeico del propóleo.¹⁹

➤ Antioxidante

Se le atribuye esta actividad a los flavonoides, los cuales constituyen un intermediario en la oxidación del ácido ascórbico (vitamina C), para intervenir en la aceleración de reacciones bioquímicas en que participa este compuesto, y desempeñar el papel de coenzima.

3 OBJETIVOS

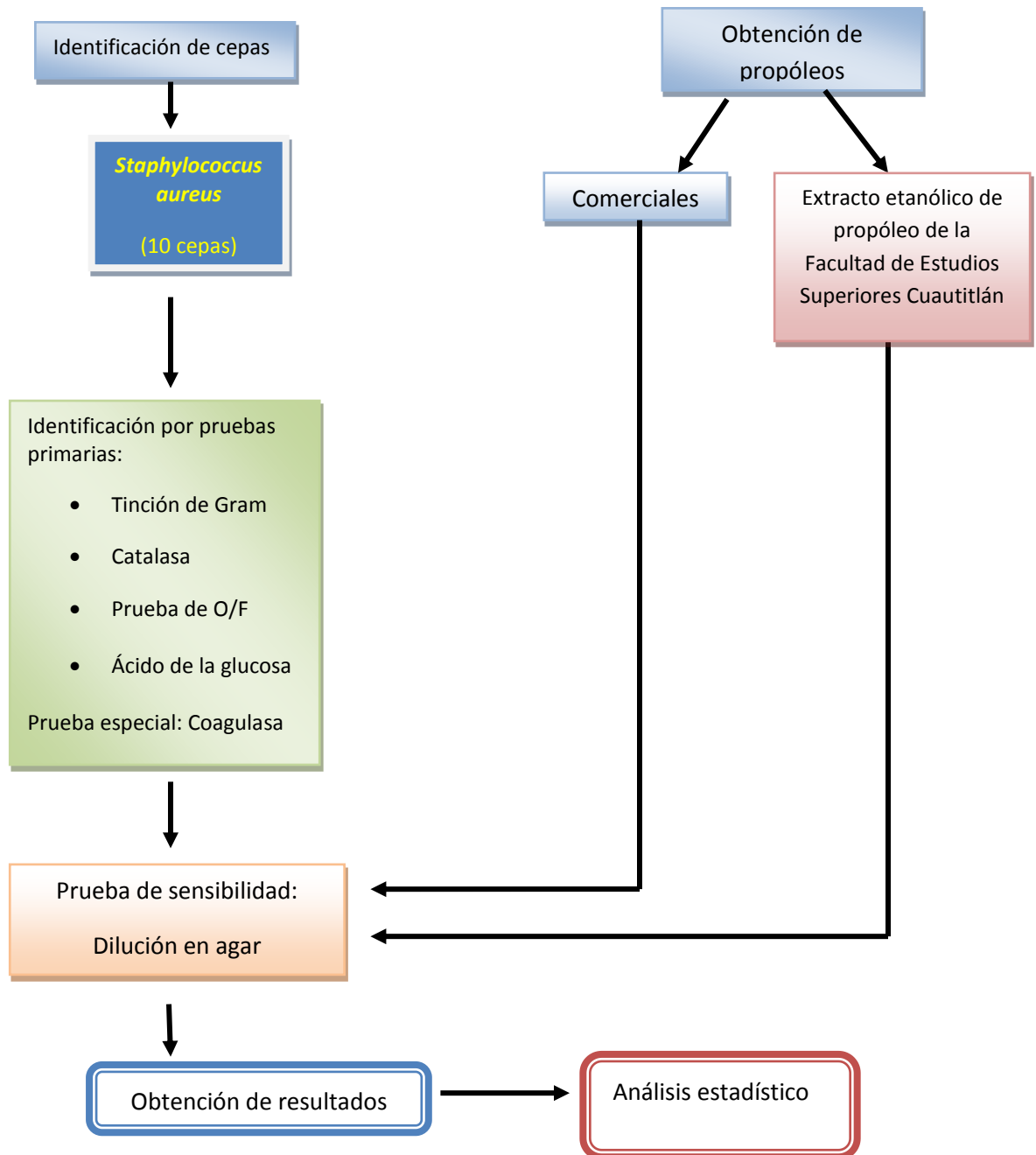
Analizar la actividad *in vitro* de diferentes propóleos contra cepas de *Staphylococcus aureus* provenientes de mastitis bovina.

Evaluar la inhibición del crecimiento bacteriano (*Staphylococcus aureus*) de cuatro propóleos comerciales y un propóleo producido en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

4 HIPÓTESIS

El propóleo tiene actividad inhibitoria del crecimiento de microorganismos, por lo tanto deberá inhibir el crecimiento de cepas de *Staphylococcus aureus*, que produce mastitis bovina.

5 DISEÑO EXPERIMENTAL



6 MATERIAL Y MÉTODOS.

6.1 Propóleos

El propóleo 1 fue recolectado del apiario de la Facultad de Estudios Supiores Cuautitlán, Campo 4, localizada en el municipio de Cuautitlán Izcalli, estado de México, el cual se encuentra en la parte noroeste de la cuenca de México. Sus coordenadas geográficas son: 19º 40' 50'' de latitud norte y 99º 12' 25'' de latitud oeste, a 2683 msnm.

Los otros cuatro propóleos fueron recolectados al azar de distintas farmacias naturistas, que venden este y otros productos de la colmena.

6.2 Preparación del extracto de propóleo proveniente de la FESC, identificado como número 1.

Este propóleo fue procesado en el laboratorio de Química Orgánica de Campo I (FESC).

Se limpió de restos de abejas y maderas, ya que provenía de las rejillas del apiario; luego se pesó el propóleo en greña; posteriormente, se le agregaron 200 ml de etanol al 70%, de manera que quedara bien cubierto por éste. Se mantuvo en un envase color ámbar y en un lugar fresco, debido a que este producto, es muy sensible a los rayos del sol, así como a las altas temperaturas.

Fue necesario homogeneizar diario por un minuto hasta remover lo que se asentaba en el fondo del envase. Permaneció en estas condiciones por diez días, y se llevó al laboratorio de Química Orgánica de Campo I, para que por medio del rotavapor, se pudiera lograr una extracción del etanol, dando como resultado un extracto etanólico de propóleo.

6.3 Microorganismos

Para el presente trabajo se utilizaron diez cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de casos de mastitis bovina, proporcionadas por el laboratorio 6 de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria (UIM) de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (FESC) Campo 4.

Para corroborar que fueran las bacterias correspondientes, se sometieron a pruebas de identificación primaria; y a la prueba especial de Coagulasa. De esta manera se pudo afirmar que se trabajó con 10 cepas de *Staphylococcus aureus*.

Cepa	T. Gram	Morfología	Agrupación	Catalasa	Ácido de la glucosa	Coagulasa
1	+	Cocos	racimo de uva	+	+ color rosa	+
2	+	Cocos	racimo de uva	+	+ color rosa	+
3	+	Cocos	racimo de uva	+	+ color rosa	+
4	+	Cocos	racimo de uva	+	+ color rosa	+
5	+	Cocos	racimo de uva	+	+ color rosa	+
6	+	Cocos	racimo de uva	+	+ color rosa	+
7	+	Cocos	racimo de uva	+	+ color rosa	+
8	+	Cocos	racimo de uva	+	+ color rosa	+
9	+	Cocos	racimo de uva	+	+ color rosa	+
10	+	Cocos	racimo de uva	+	+ color rosa	+

Tabla 2. Resultados de las pruebas de identificación primaria para las cepas de *S. aureus* y de la prueba de coagulasa. (Pérez, 2011)

6.4 Prueba cuantitativa de sensibilidad (Prueba de dilución en agar)

Las bacterias fueron sembradas en agar Mueller Hinton (DIBICO), a una temperatura de 35° C, durante 24 hrs. antes de correr la prueba.

Los propóleos fueron utilizados directamente en el agar (mediante la elaboración de un stock para cada propóleo), a concentraciones de 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 y 3.0

mg/ml respectivamente. Se prepararon 80 placas chicas de Petri, con 6 ml de agar cada una.

Para el stock, se pesaron 150 mg de extracto en un tubo Eppendorf (para cada propóleo) y se diluyeron en 800 μ l de etanol al 70%. Una vez listos, se tomaron los μ l necesarios de medio y se sustituyeron por la misma cantidad del stock de cada propóleo.

Se estandarizó el inóculo de bacterias a 0.5 del Nefelómetro de Macfarland (en el espectrofotómetro se igualó a la densidad óptica de 0.08 a 0.1 a 625 nm.). Se sembraron en todas las placas de Petri, por medio de la técnica de punteo, realizado con una micro pipeta, tomando 5 μ L para los tres puntos de cada cepa (10 cepas).

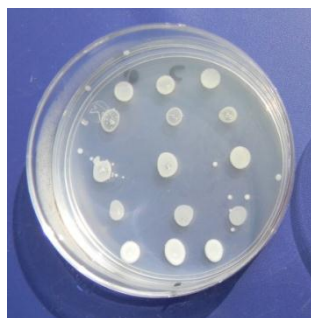


Fig. 7 Técnica de punteo (Pérez 2011).

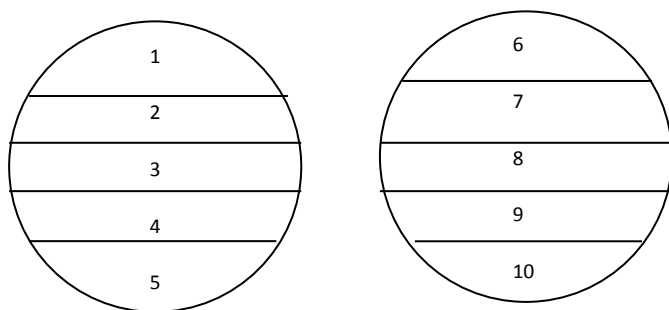


Fig. 8 En este diagrama se muestra el orden en que se sembraron las diez cepas.

Se incubaron en estufa a 35 °C, y la lectura se realizó a las 24 y 48 hrs. respectivamente.

Fue determinada la Concentración Mínima Inhibitoria de cada extracto.

Los resultados fueron analizados mediante la prueba de comparación múltiple de Tuckey's con ANOVA mediante el uso del programa GraphPad PrismVersion 4.

7. RESULTADOS

El crecimiento observado se registró a las 24 y 48 hrs. de incubación. No hubo diferencia en los resultados de las lecturas hechas a las 24 hrs. y a las 48 hrs.

PROPÓLEO 1 (FESC)

	CONCENTRACION	CEPAS										CONTROL
	mg/ml	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
P	0.125	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
R	0.25	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
O	0.5	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
P.	1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
F	1.5	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
E	2	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
S	2.5	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
C	3	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)

Tabla 3. Resultados de la prueba de dilución en agar del propóleo 1(FESC). El signo (+) se refiere a que hubo crecimiento de las colonias en el agar, y el (-) se refiere a que no hubo crecimiento.

La cepa 7 fue inhibida desde 0.125 mg/ml, que fue la concentración más baja probada.

Las cepas 4, 5, 6, 8, 9 y 10 fueron inhibidas en 0.25 mg/ml, considerándose ésta su CMI; mientras que las cepas 1, 2, y 3 presentaron una CMI de 0.5 mg/ml.

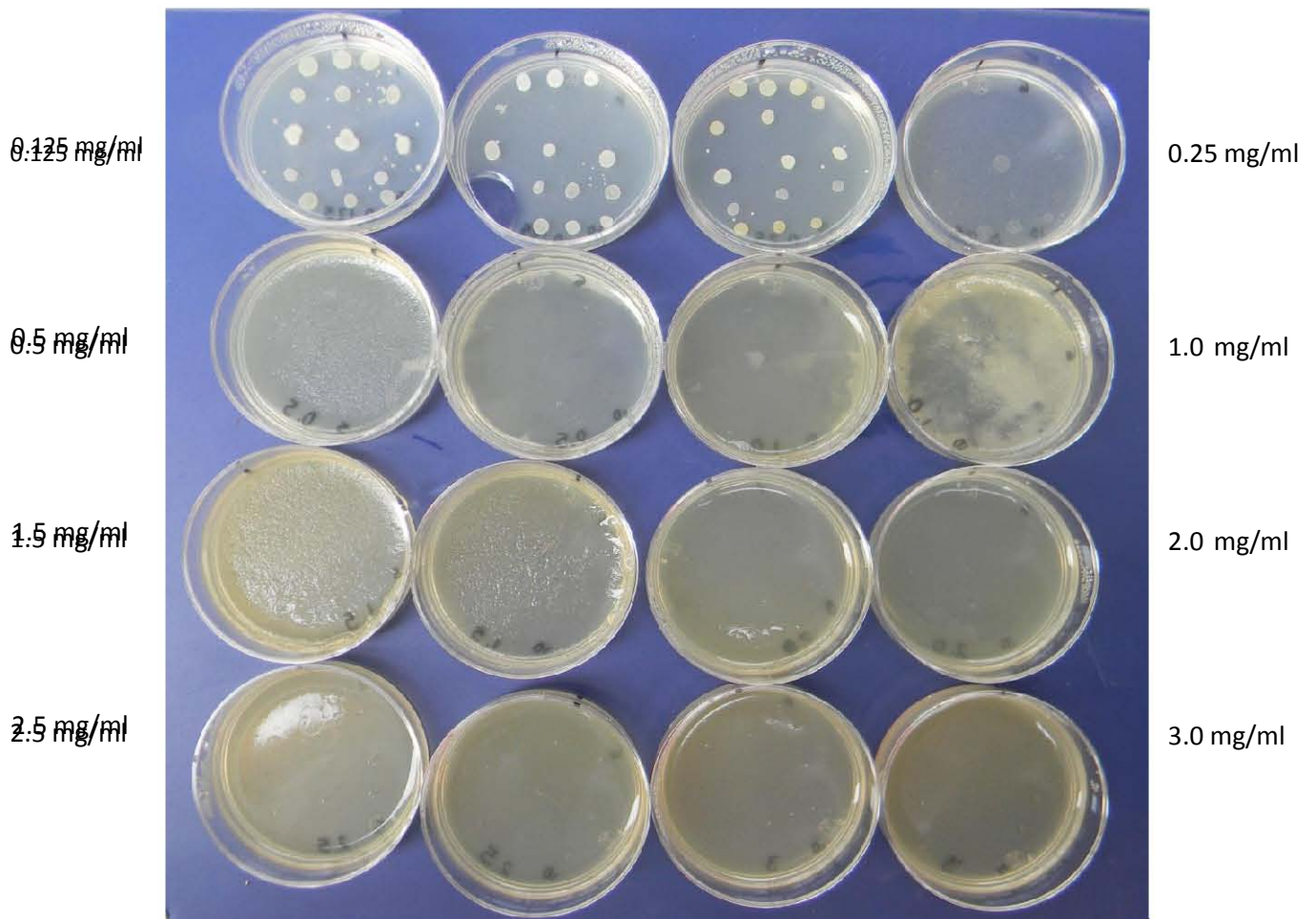


Fig. 9 Prueba de dilución en agar del propóleo 1 (FESC). Arriba se aprecia el crecimiento de las colonias en el agar de control, (agar Mueller Hinton sin propóleo). En A1 se observan de la cepa 1 a la 5; en A2 se observan de la cepa 6 a la 10. Abajo se observan las ocho diluciones de este propóleo, en el cual observamos el crecimiento bacteriano hasta la concentración de 0.25 mg/ml.

PROPOLEO 2

	CONCENTRACION	CEPAS										CONTROL
	mg/ml	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
P R O P. 2	0.125	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	0.25	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	0.5	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	1	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
	1.5	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
	2	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
	2.5	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
	3	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)

Tabla 4. Resultados de la prueba de dilución en agar para el propóleo 2.

Las cepas 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 fueron inhibidas a 1 mg/ml, la cual es considerada su CMI.

La cepa 3 presenta una CMI mayor a > 3 mg/ml que fue la concentración más alta evaluada.

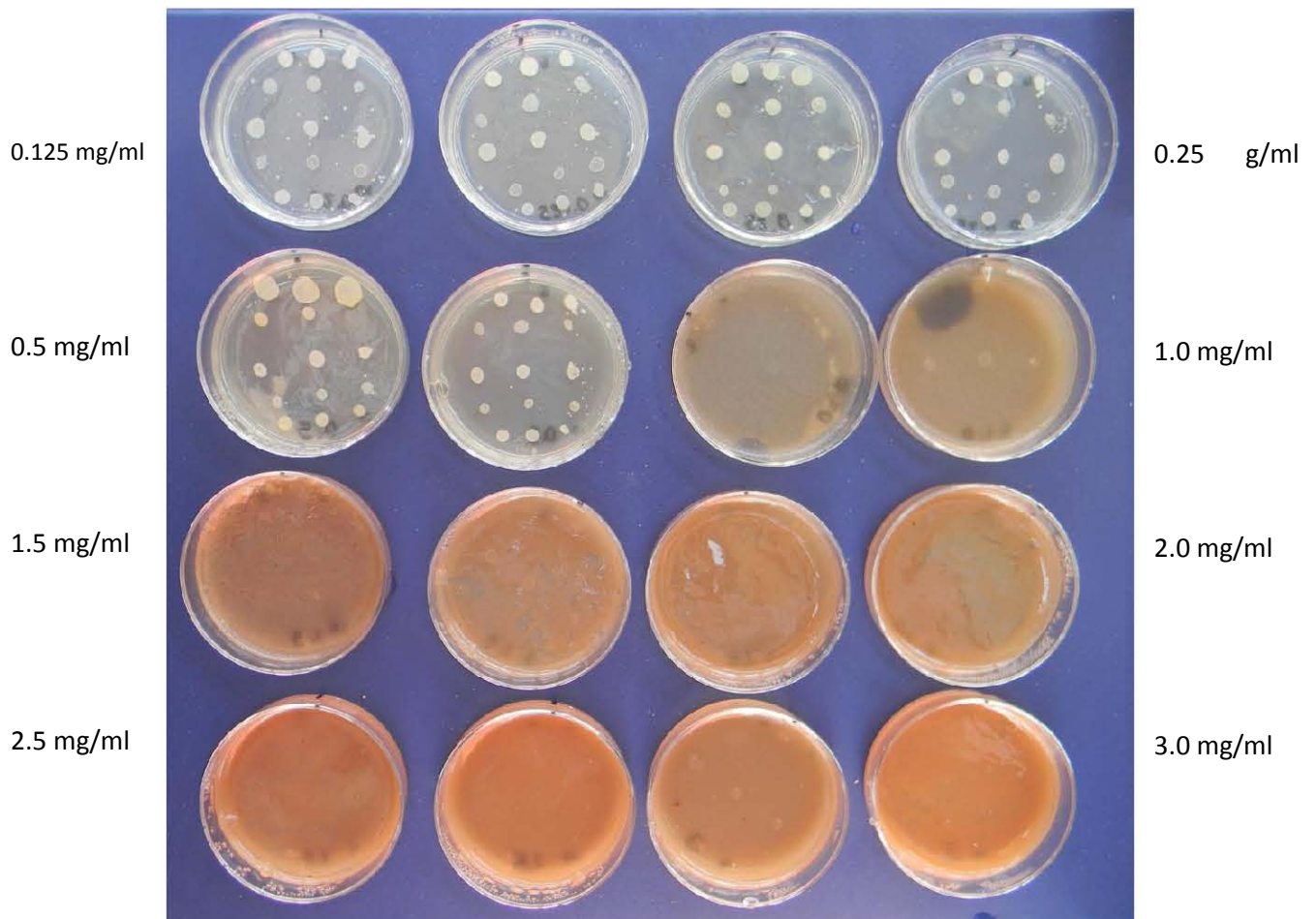


Fig. 10 Prueba de dilución en agar del propóleo 2. Arriba se aprecia el crecimiento de las colonias en el agar de control, (agar Mueller Hinton sin propóleo). En A1 se observan de la cepa 1 a la 5; en A2 se observan de la cepa 6 a la 10. Abajo se observan las ocho diluciones de este propóleo, en el cual observamos el crecimiento bacteriano hasta la concentración de 1 mg/ml.

PROPOLEO 3

	CONCENTRACION	CEPAS										CONTROL
	mg/ml	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
P R O P. 3	0.125	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	0.25	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	0.5	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	1	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)
	1.5	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)
	2	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)
	2.5	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)
	3	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(+)

Tabla 5. Resultados de la prueba de dilución en agar para el propóleo 3.

Las cepas 9 y 10 fueron inhibidas la concentración de 1.0 mg/ml, la cual es considerada su CMI.

Las cepas 6 y 7 presentan una CMI de 1.5 mg/ml, ya que en esta concentración ya no se observó crecimiento.

Las cepas 1, 2, 4 y 5 fueron inhibidas en 2 mg/ml, considerándose ésta su CMI.

Las cepas 3 y 8 no presentaron inhibición en ninguna de las ocho concentraciones evaluadas.

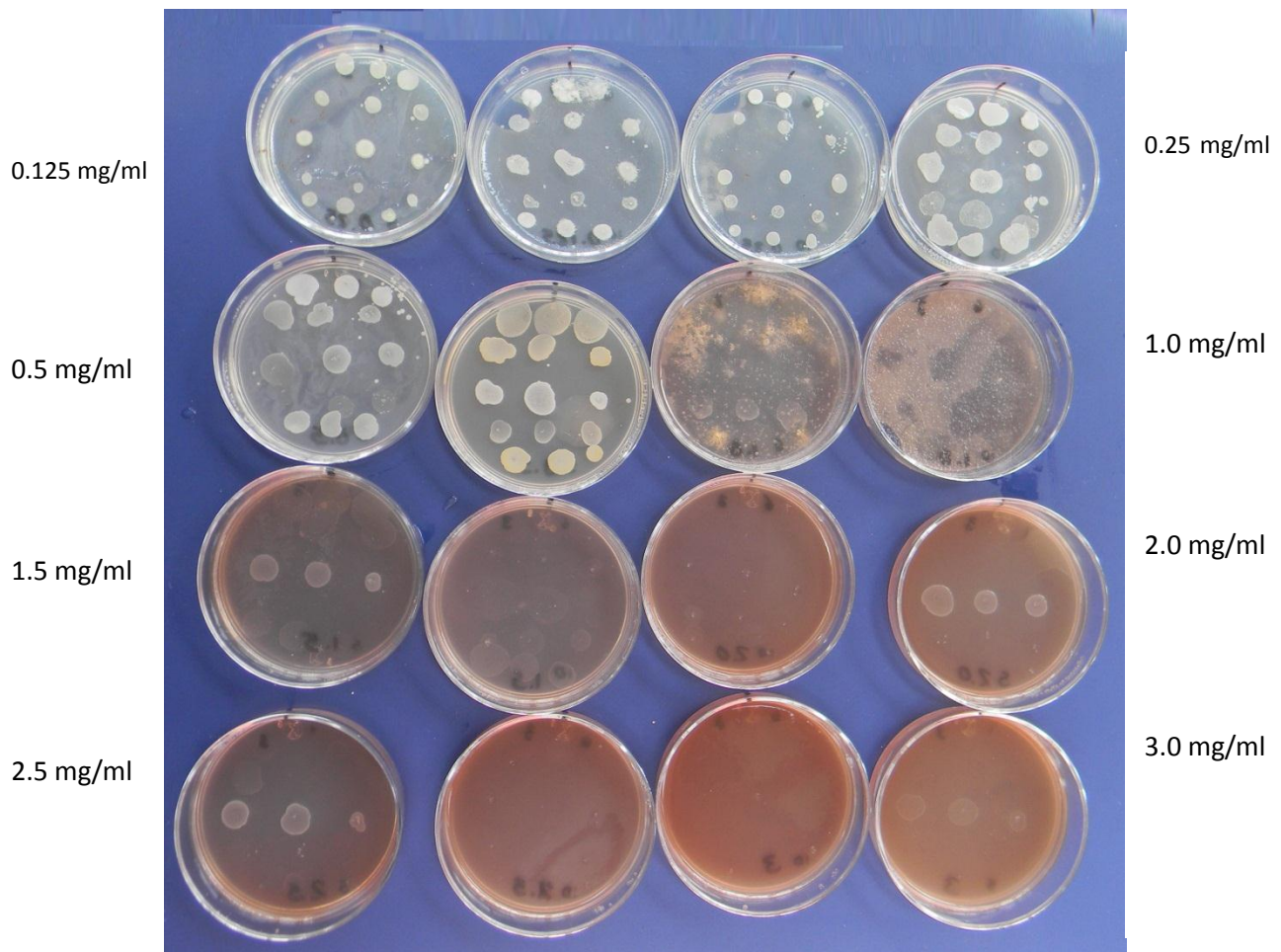


Fig. 11 Prueba de dilución en agar del propóleo 3. Arriba se aprecia el crecimiento de las colonias en el agar de control, (agar Mueller Hinton sin propóleo). En A1 se observan de la cepa 1 a la 5; en A2 se observan de la cepa 6 a la 10. Abajo se observan las ocho diluciones de este propóleo; se observa el crecimiento de la cepa 3 y 8 hasta la dilución de 3 mg/ml.

PROPOLEO 4 Y 5

	CONCENTRACION	CEPAS										CONTROL	
	mg/ml	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
P. R. O. P. 4 Y 5	0.125	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	0.25	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	0.5	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	1	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	1.5	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	2	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	2.5	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
	3	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)

Tabla 6. Resultados de la prueba de dilución en agar para el propóleo 4 y 5.

Se observa el crecimiento de las diez cepas en las ocho concentraciones evaluadas tanto para el propóleo 4, como para el 5.

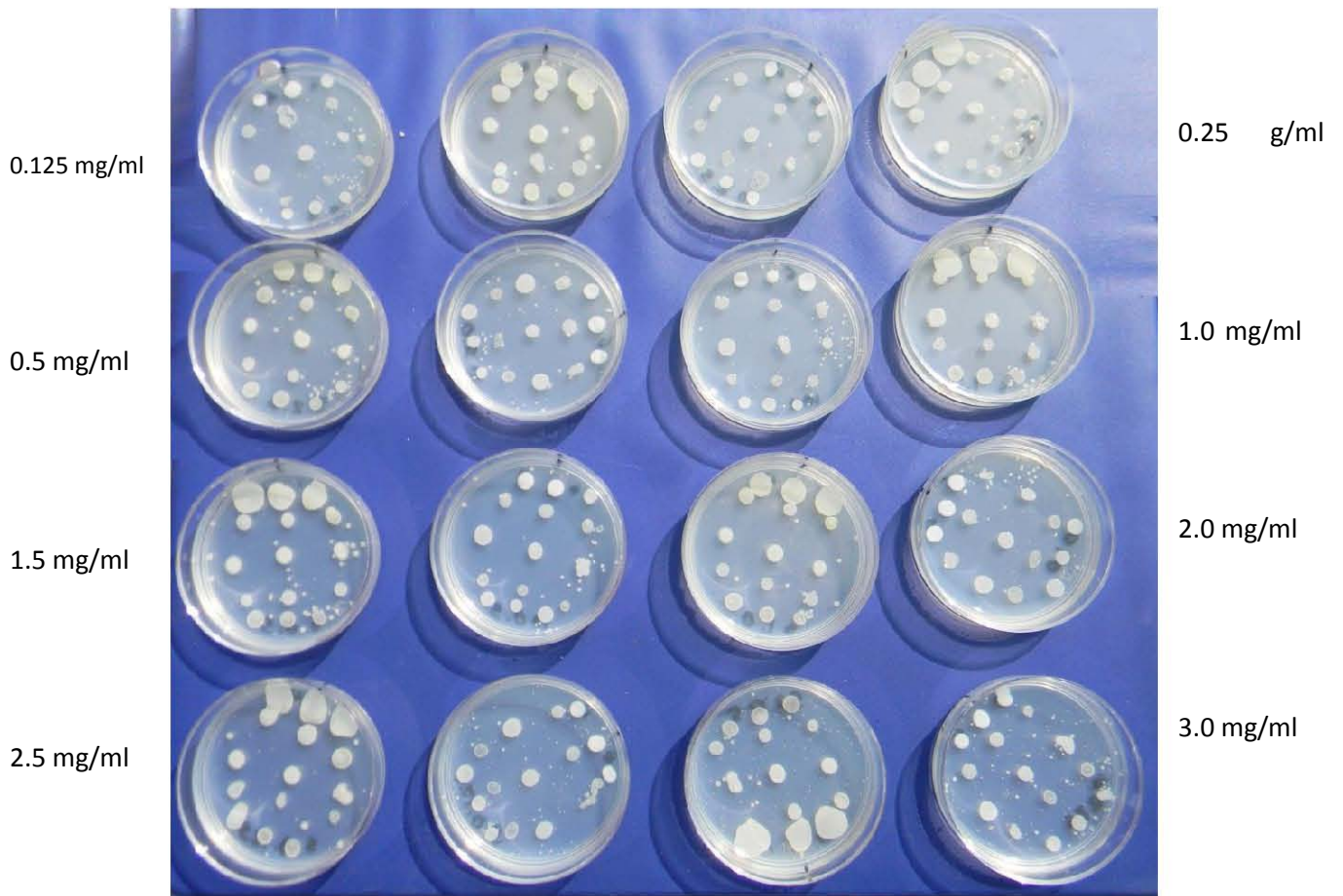


Fig. 12 Prueba de dilución en agar del propóleo 4. Arriba se aprecia el crecimiento de las colonias en el agar de control, (agar Mueller Hinton sin propóleo). En A1 se observan de la cepa 1 a la 5; en A2 se observan de la cepa 6 a la 10. Abajo se observan las ocho diluciones de este propóleo; se observa el crecimiento de las diez cepas en todas las concentraciones.

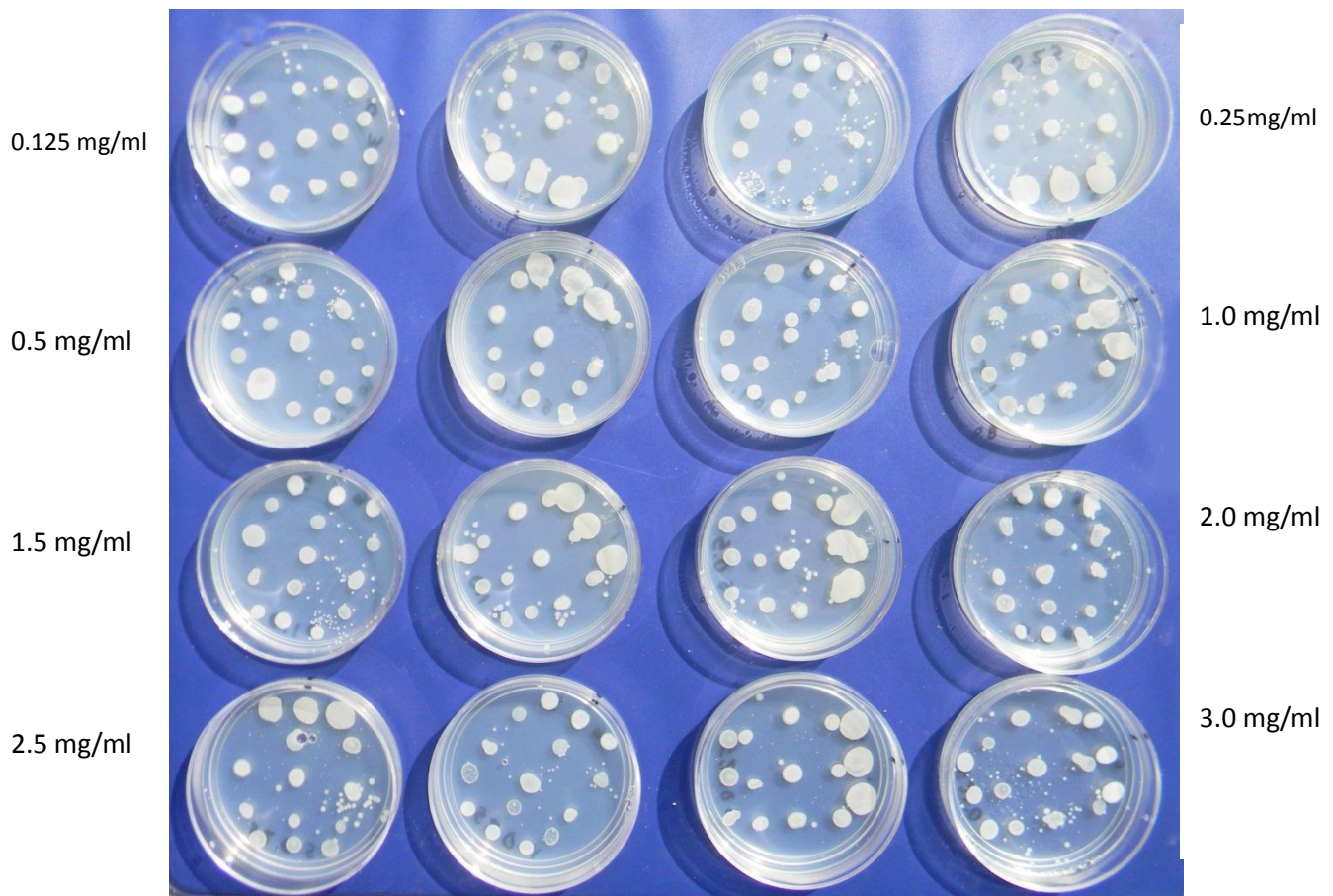


Fig. 13 Prueba de dilución en agar del propóleo 5. Se aprecia el efecto nulo en todas concentraciones del propóleo número 5.

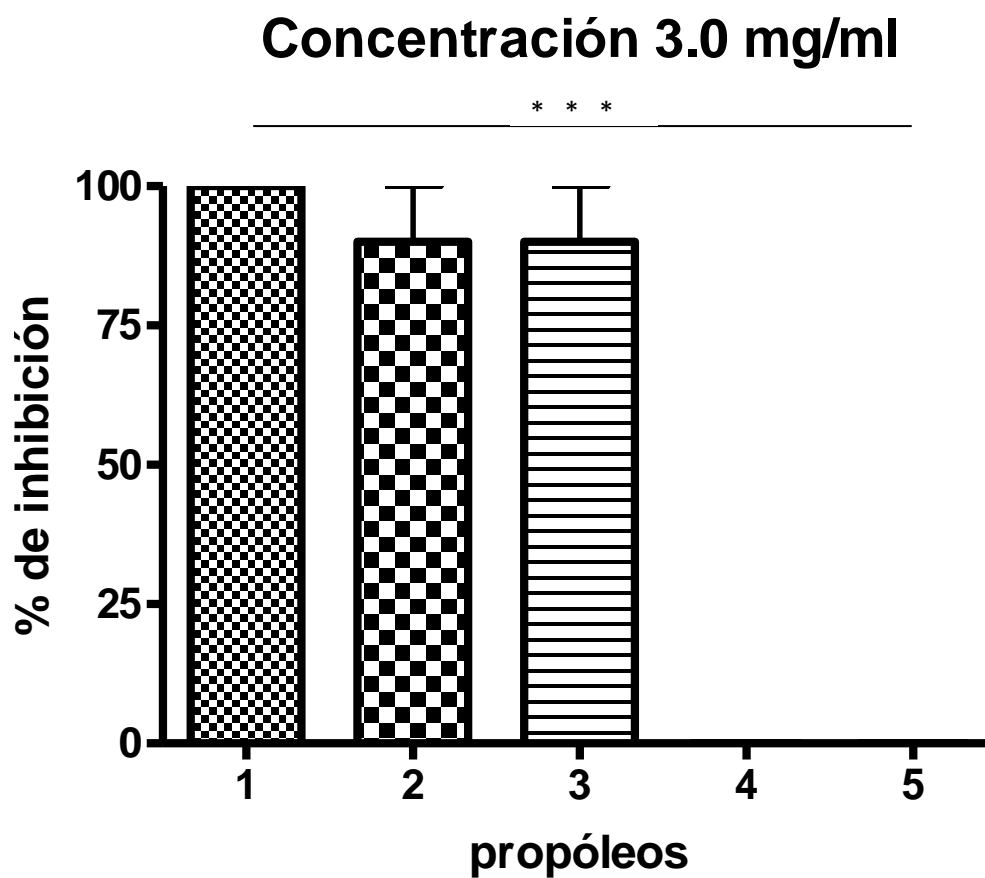
El propóleo número 4 y 5, no mostraron efectos de inhibición con ninguna de las cepas probadas, en ninguna concentración.

7.1 RESULTADOS ESTADÍSTICOS

Las pruebas estadísticas se realizaron con la prueba de comparación múltiple de Tuckey's con ANOVA mediante el uso del programa GraphPad PrismVersion 4.

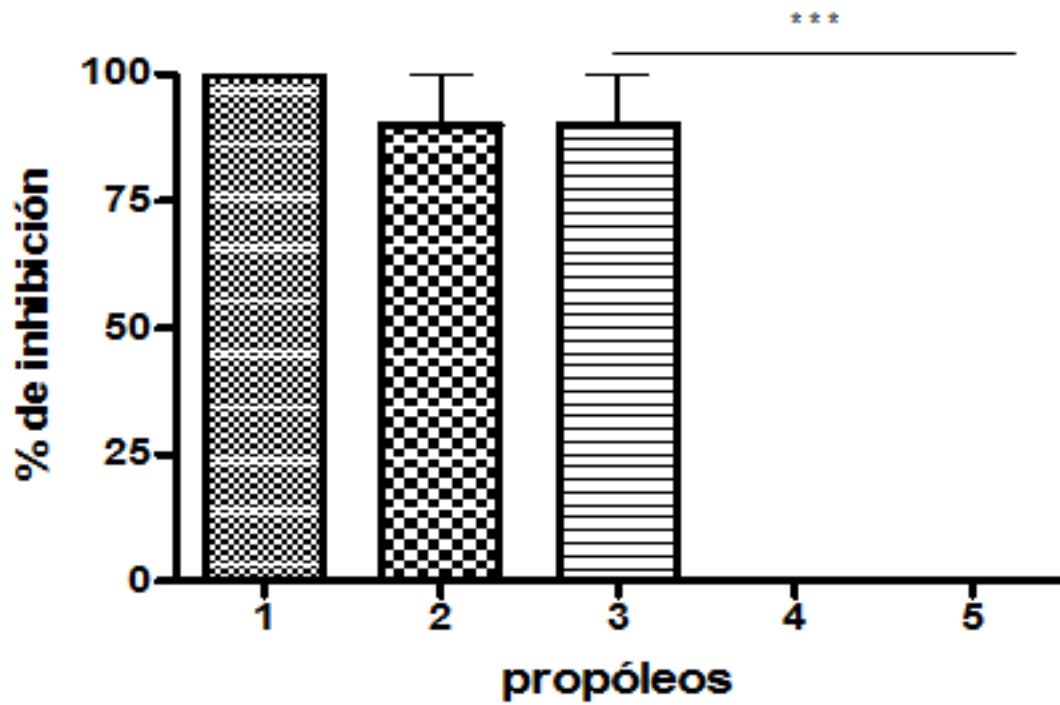
Estadísticamente, se obtuvo una significancia $p < 0.0001$ para siete de ocho concentraciones.

A continuación se observan las gráficas estadísticas de cada concentración:



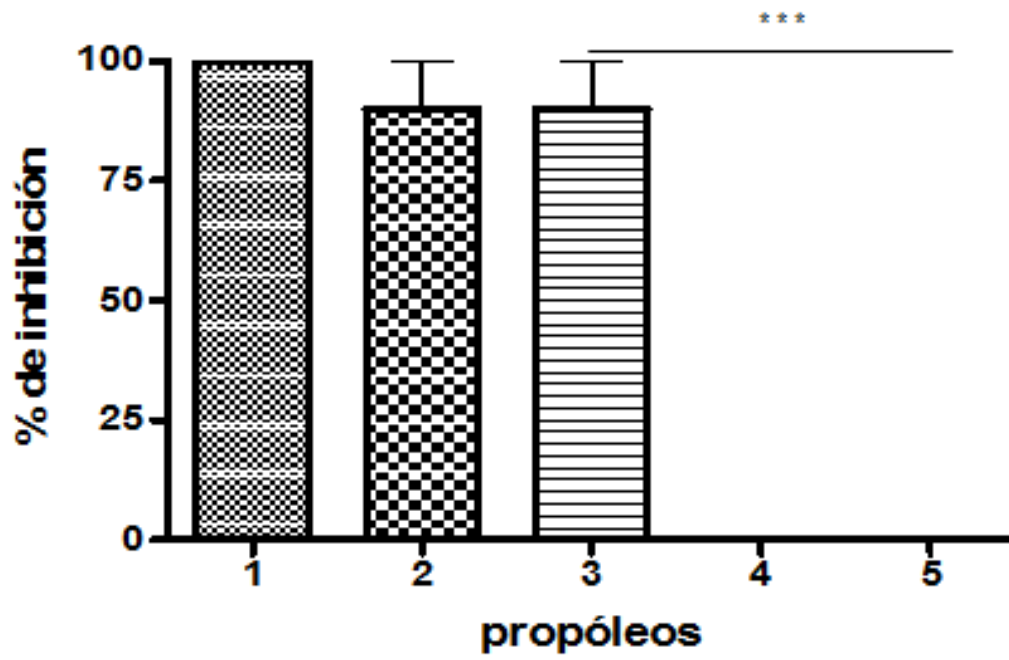
Gráfica 1. Comparación de los porcentajes de inhibición en la concentración 3 mg/ml de las cepas de *S. aureus* por los propóleos 1(FESC), 2, 3, 4 y 5. Diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.0001$) de los propóleos 1(FESC), 2 y 3 comparados con los propóleos 4 y 5.

Concentración 2.5 mg/ml



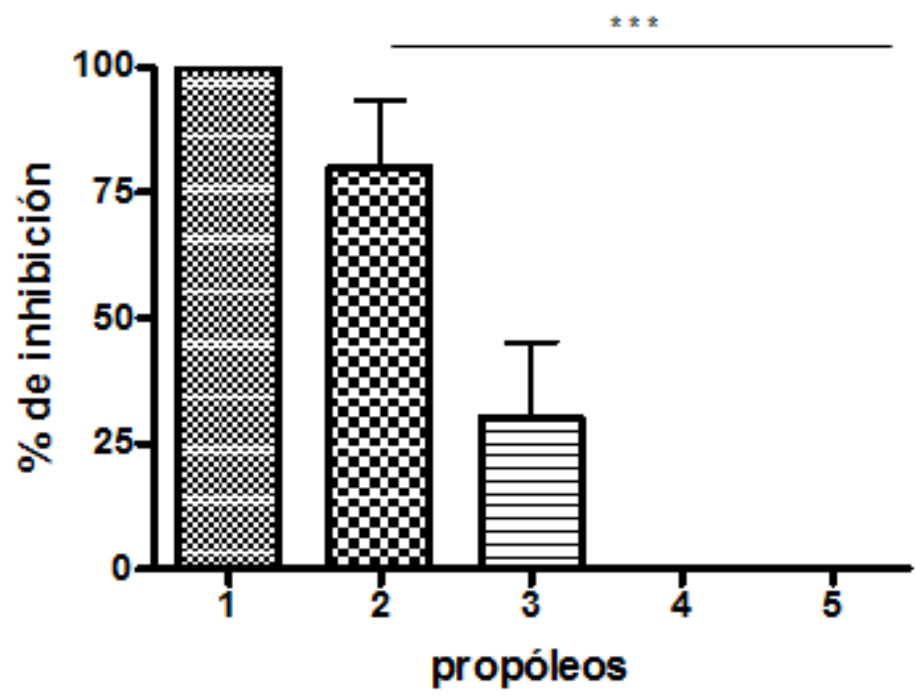
Gráfica 2. Comparación de los porcentajes de inhibición en la concentración 2.5 mg/ml de las cepas de *S. aureus* por los propóleos 1(FESC), 2, 3, 4 y 5. Diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.0001$) de los propóleos 1(FESC), 2 y 3 comparados con los propóleos 4 y 5.

Concentración 2.0 mg/ml



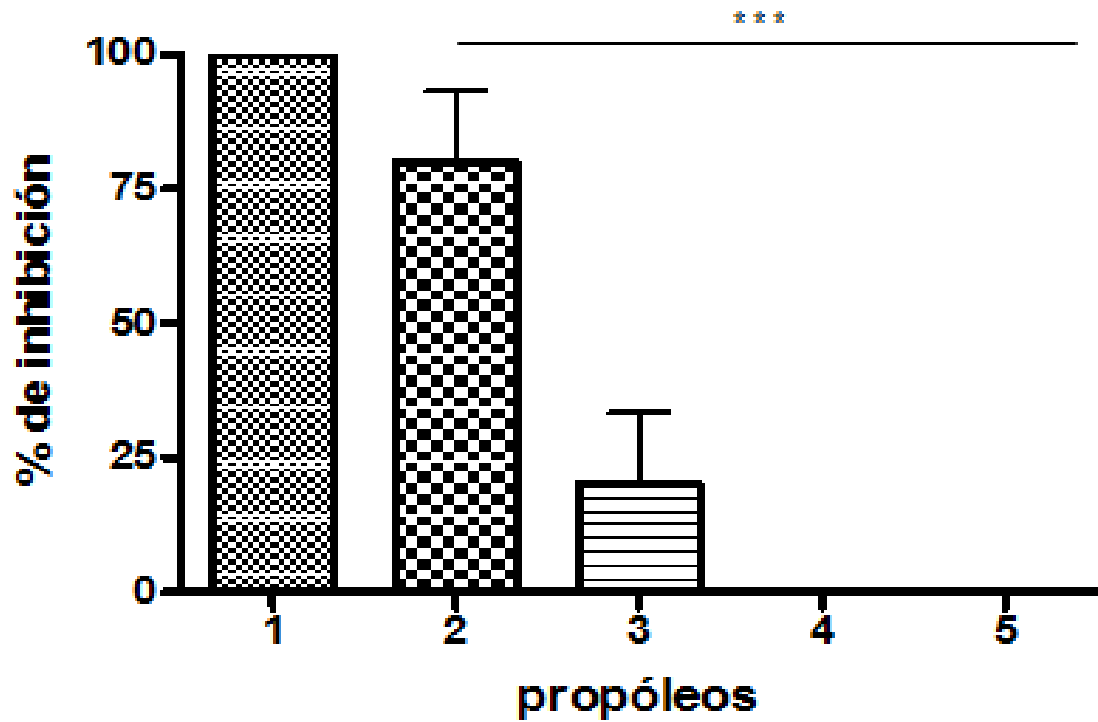
Gráfica 3. Comparación de los porcentajes de inhibición en la concentración 2.0 mg/ml de las cepas de *S. aureus* por los propóleos 1(FESC), 2, 3, 4 y 5. Diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.0001$) de los propóleos 1(FESC), 2 y 3 comparados con los propóleos 4 y 5.

Concentración 1.5 mg/ml



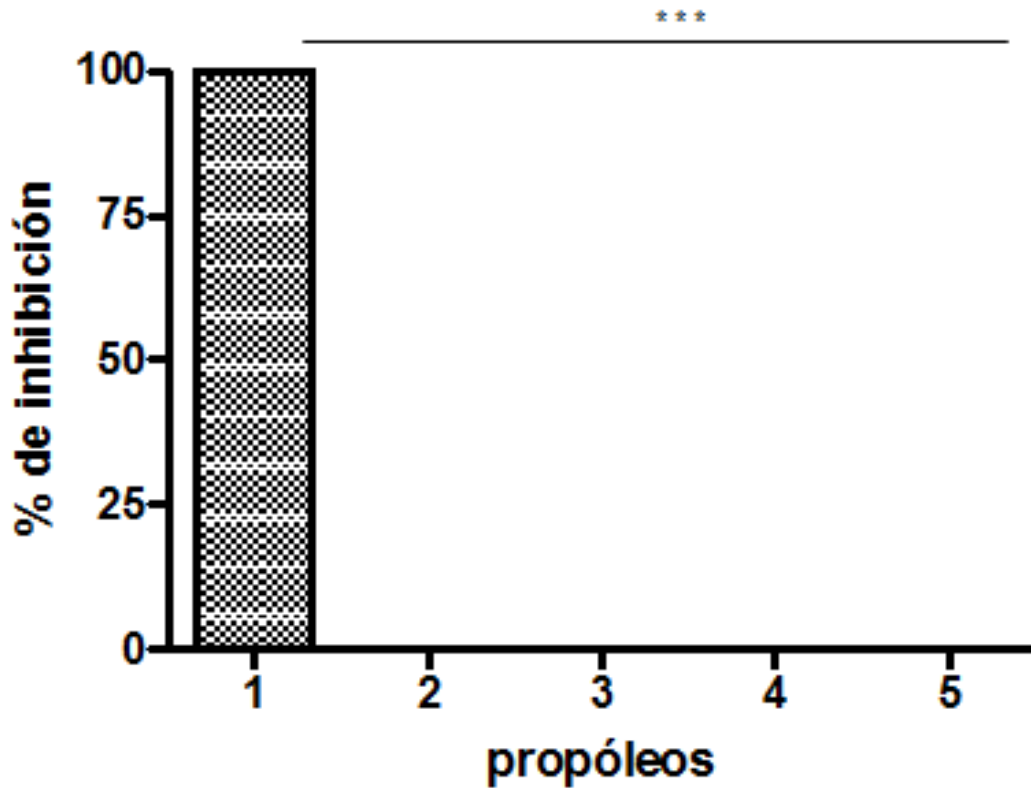
Gráfica 4. Comparación de los porcentajes de inhibición en la concentración 1.5 mg/ml de las cepas de *S. aureus* por los propóleos 1(FESC), 2, 3, 4 y 5. Diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.0001$) de los propóleos 1(FESC) y 2 comparados con los propóleos 3, 4 y 5.

Concentración 1.0 mg/ml



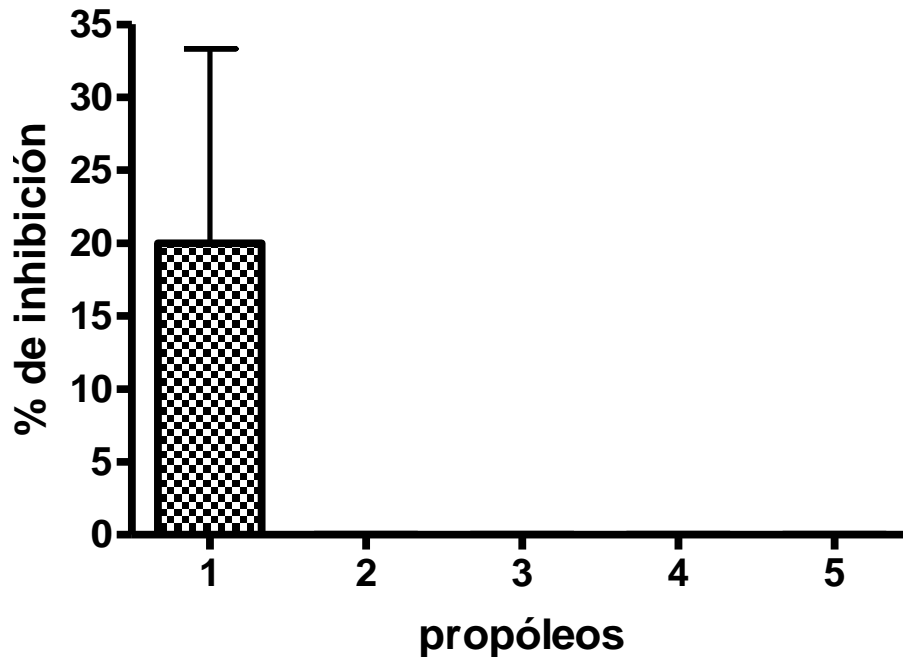
Gráfica 5. Comparación de los porcentajes de inhibición en la concentración 1.0 mg/ml de las cepas de *S. aureus* por los propóleos 1(FESC), 2, 3, 4 y 5. Diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.0001$) de los propóleos 1(FESC) y 2 comparados con los propóleos 3, 4 y 5.

Concentración 0.5 mg/ml



Gráfica 6. Comparación de los porcentajes de inhibición en la concentración 0.5 mg/ml de las cepas de *S. aureus* por los propóleos 1(FESC), 2, 3, 4 y 5. Diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.0001$) del propóleo 1(FESC) comparados con los propóleos 2, 3, 4 y 5.

Concentración 0.25 mg/ml



Gráfica 7. Comparación de los porcentajes de inhibición en la concentración 0.25 mg/ml de las cepas de *S. aureus* por los propóleos 1(FESC), 2, 3, 4 y 5. Diferencia estadísticamente no significativa.

La concentración de 0.25 mg/ml, en el propóleo 1(FESC), fue el único que inhibió las cepas 6 y 7, sin embargo, esto no es relevante debido a que solo fueron dos cepas de diez. En los otros propóleos hay crecimiento del 100%.

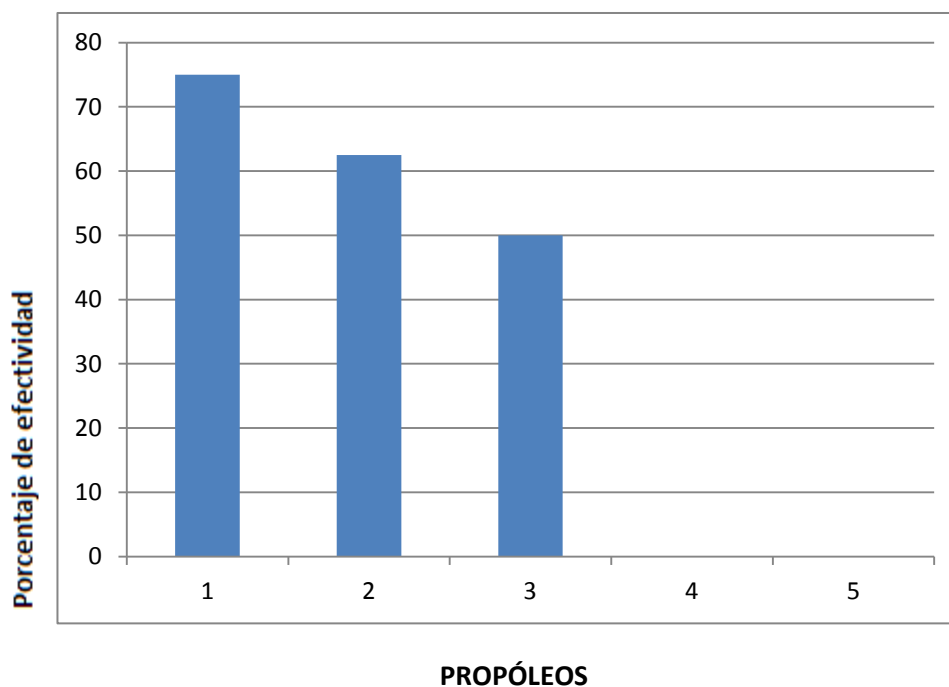
No se presenta gráfica de la concentración de 0.125 mg/ml, ya que todas las cepas crecieron a esta concentración, por lo que esta concentración no es significativa para la prueba estadística.

7.2 Panorama general

Solo los propóleos de la FESC, el número 2 y el número 3, presentaron actividad antimicrobiana contra las cepas probadas.

PROPÓLEOS	EFFECTIVIDAD %
1 FESC	75
2	62.5
3	50
4	0
5	0

Tabla 7. En esta tabla se muestra el grado de efectividad observada con todos los propóleos.



Gráfica 8. En esta grafica se observa que el propóleo con mayor efectividad es el asignado con el número 1, correspondiente al propóleo de la FESC.

El porcentaje de inhibición toma en cuenta la inhibición del crecimiento de las 10 cepas probadas. Como se observa, el único propóleo que tiene el 100% es el número 1. Indicando con esto que el propóleo 4 y 5 tienen un 0% de inhibición.

8 DISCUSION.

En estudios realizados para desafiar distintos propóleos de Croacia, utilizaron cultivos de *S. aureus* para pruebas *in vitro*, encontrando una CMI de entre 0,65 a 7.81 mg/ml, dependiendo esto del contenido de flavonoides contenidos.²⁸

En otro estudio, evaluando propóleos *in vitro*, contra agentes productores de mastitis bovina, tal como el *S. aureus*, se reporta una CMI de 5 mg/ml.²³ En este trabajo, los resultados obtenidos indican que el propóleo que mejor actividad presentó fue el número 1(FESC); se encontró una CMI de 0.5 mg/ml, variando 0.45 mg en comparación con el estudio mencionado anteriormente, esto seguramente se debió a la cantidad de flavonoides que posee cada propóleo, dependiendo también época del año además de la vegetación de donde fueron recolectados.

En otro trabajo realizado en Ecuador, se encontró que la CMI para esta misma bacteria era de 0.5 a 2%, 500 veces más que la CMI encontrada en este estudio.³³

Sin embargo, otro estudio realizado en Cuba demostró que la CMI del propóleo evaluado estaba entre 0.05 mg/ml y 45 mg/ml, para *S. aureus*. Lo que difiere bastante con los resultados obtenidos en este trabajo.³⁶

Estudios realizados en Egipto, muestran los resultados de extractos etanolicos de Egipto y Bulgaria, los cuales demuestran una CMI mayor a 100 mg/ml.³⁶

Desde 1963 se realizan estudios en contra de *S. aureus* demostrando que los extractos evaluados presentaron una CMI de 1.5 a 3 mg/ml; estos resultados coinciden con las concentraciones evaluadas en este trabajo, ya que la máxima concentración evaluada fue de 3 mg/ml, sin embargo, dependiendo de cada propóleo el crecimiento de las cepas es variable.

Todos los estudios reportan CMI muy diferentes, lo que probablemente se debe a la composición de los diferentes propóleos que han sido utilizados; incluso en este trabajo,

se observó una diferencia muy marcada entre los propóleos producidos comercialmente y el propóleo procesado en la FESC. La actividad antimicrobiana y las demás propiedades, difieren entre los propóleos, por diversas causas que tienen que ver desde donde esta ubicada la colmena, hasta los árboles que visitan las abejas pecoreadoras, la época del año, etc.

PERSPECTIVAS

Con los resultados obtenidos en el presente trabajo, se remarca la necesidad de continuar con la investigación de este producto para poder establecer su mecanismo de acción sobre el microorganismo *S. aureus*.

También se pretende, llevar a cabo pruebas *in vivo* bajo un modelo experimental, que permita probar la actividad antimicrobiana del propóleo en los animales afectados. Todo esto encaminado a la elaboración de un producto a base de este compuesto de la colmena para el tratamiento efectivo de la mastitis; que además pueda ser administrado por vía intramamaria teniendo la ventaja de que no afectará al animal tratado, ni la calidad de la leche, ni a las personas que la consuman.

9 CONCLUSIONES

1. Se puede concluir que la actividad *in vitro* del propóleo 1 (FESC) fue muy buena, en comparación con los otros propóleos evaluados. El propóleo 2 y 3 presentaron una actividad regular, mientras que los propóleos 4 y 5 no presentaron actividad.
2. En cuanto a la inhibición del crecimiento de las cepas de *Staphylococcus aureus*, la concentración que inhibió al 100% en el propóleo 1 fue la concentración de 0.5 mg/ml, siendo este el mejor resultado obtenido en este estudio.
3. Se encontraron dos cepas muy resistentes, identificadas como 3 y 8, para las cuales se recomienda realizar más pruebas, con concentraciones más altas a las probadas, hasta llegar a la CMI de las bacterias, ya que aún en la concentración de 3 mg/ml, se encontró crecimiento sobre el agar, en tres de los cinco productos evaluados. Vale la pena mencionar que este crecimiento fue disminuido drásticamente, sin embargo la concentración no inhibió por completo su desarrollo.
4. Con esto, tenemos que no todos los propóleos que se comercializan, en las tiendas naturistas principalmente, tienen un efecto inhibitor de esta bacteria, por lo que es de esperarse su escaso resultado también de sus otras propiedades.
5. Es necesario estandarizar normas de calidad para la venta de propóleos de buena calidad, tal como ya lo hacen en otros países del mundo, por ejemplo Rusia; en algunos otros países como Argentina, Alemania, o Perú, hay estandarizaciones que miden la cantidad de flavonoides y otros compuestos que certifican la buena actividad antimicrobiana y antioxidante de este producto.^{35, 38, 42}

10 BIBLIOGRAFÍA

1. Bedolla CC, Ponce de León MER. Pérdidas económicas ocasionadas por la mastitis bovina en la industria lechera. REDVET. Revista electrónica de Veterinaria 1695-7504. 2008 Volumen IX Número 4.
2. El Manual Merck de Veterinaria, Sexta Edición, Merck & CO., INC, Centrum, 2007; 1100.
3. Wolter W, Castañeda VH, Kloppert B, Zchoeck M. La Mastitis Bovina. Instituto Estatal de Investigaciones de Hesse, I.E.I. Hesse, Marburgerstrasse 54 D-35396 Giessen Germany, Universidad de Guadalajara Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Depto. de Salud Pública. Carretera Guadalajara-Nogales. Zapopan, Jalisco, México.2002.
4. Bath DL. Ganado lechero. Principios, prácticas, problemas y beneficios. 2da. Edición. Nueva editorial Interamericana S. A. de C. V. México D. F. 1986; 309:326, 357:362.
5. Radostis OM, *et al*, Medicina Veterinaria, Vol. I, Novena edición, Ed. Mc Graw Hill.España, 2002; 711:737, 778-779.
6. Amstutz HE, Bovine Medicine and Surgery, Vol. II, American Veterinary Publications, Inc., United States of America, 1980. 1047: 1086.
7. Chaves, Javier 1, 2,3 M. V. Mastitis bovina: su control y prevención es una tarea permanente. 1 Facultad de Ciencias Veterinarias de la UBA, 2 Chaves & Asoc., Olivos, Buenos Aires, Argentina, 3 Comisión Técnica de ALMAST.
8. Scanlan CHM. Introducción a la bacteriología veterinaria, Ed. Acribia S. A. Zaragoza, España, 1991; 45:66, 73:78.
9. Bedolla, CC; Castañeda, VH; Wolter, W. Métodos de detección de la mastitis bovina. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Michoacana de San Nicolas de Hidalgo. Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias. Universidad de Guadalajara. Landesbetrieb Hessisches Landeslabor,

- Marburgerstrasse 54, D-35396 Giessen, Germany. REDVET. Revista electrónica de Veterinaria. ISSN 1695-7504. 2007 Volumen VIII Número 9. 01 Septiembre 2007.
10. Betancourt O., Scarpa C., Villagrán K., Estudio de resistencia de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de mastitis subclínica bovina frente a cinco antibióticos en tres sectores de la IX región de Chile, (Nota técnica). Revista científica, FCV-LUZ/Vol. XII, No. 5, 413-417, 2003.
 11. Bascuñan C. C., Mastitis bovina: nuevos aspectos de diagnóstico, tratamiento y control. Universidad de Chile, septiembre de 2008.
 12. Paredes DA, Rodríguez MA, Parker LE, Martínez HD, Tratamientos alternativos en el control de la mastitis clínica bovina; plasma marino, propóleos y chichipince (*Hamelia patens*).
 13. Pedraza G. C., et. al. Control de mastitis subclínica bovina durante la lactancia mediante el uso de antibióticos intramamarios. Octubre de 2009.
 14. El-Sayed Amir, et. al. Estudio comparativo de las características genotípicas de cepas de *Staphylococcus aureus* aisladas de casos de mastitis clínica y subclínica en México. Revista Veterinaria México, abril-junio, año/volumen. 37, número 002, Universidad Nacional Autónoma de México. Distrito Federal, México. Pp. 165-179.
 15. Granados Beltrán Elizabeth, "Caracterización de aislamientos de *Staphylococcus aureus* asociados a mastitis bovina en las localidades de Cotzio y Téjaro, mediante secuenciación del gen ARN ribosomal 16s". Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Morelia, Michoacán. Noviembre del 2009.
 16. Philippe J-M. Guía del apicultor, Ediciones Mindi-Prensa. Madrid España, 1990; 212: 245-246, 323-325.
 17. Lesser PR. Manual de Apicultura Moderna. Editorial Universitaria, Santiago de Chile, Abril de 2004; 200: 204.
 18. González GAR. Memorias del curso de apiterapia e industrialización de los productos de la colmena. Auditorio de la UIM, Universidad Nacional Autónoma de

- México. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campo IV. México. 26-28 de Agosto de 2010.
19. González GAR, Bernal MR, Propóleos: un camino hacia la salud. Ediciones 4 día. 1ra. Edición, 1997, Guadalajara, Jalisco, México.
 20. Marcucci MC, Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity, Biological Chemistry Laboratory, Chemical Institute of Universidade Estadual de Campinas, CP 6154, cep 13081-970, Campinas, SP, Brazil. (Received 23 June 1994; accepted 30 November 1994). *Apidologie*(1995), 26, 83-99. Elsevier/ INRA/ DIB, AGIB.
 21. Bedascarrasbure E. *et. al.* Propóleos. Caracterización y normalización de propóleos argentinos. Revisión y actualización de composición y propiedades. Ediciones MAGNA, Tucumán, Argentina. Julio de 2006.
 22. Martínez L., Rojas N., Zetina T., R., Casillas P., R. El propóleo oscuro del estado de Campeche., XXIV Seminario de Apicultura. Cuernavaca, Morelos, Julio de 2010.
 23. Gutiérrez H. E. Actividad antibacteriana y perfil químico de propóleos mexicanos sobre cepas de *Pasteurella multocida* aisladas de conejos. Tesis de Maestría en Ciencias. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Cuautitlán Izcalli, 2011, pp. 1-17.
 24. Pinto S. M., Faria J. E., Message D., Cassini A. T. S., Pereira S. C., Glosso M. M. Efecto de extractos de propóleos verdes sobre bacterias patógenas aisladas de leche de vacas con mastitis. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* vol 38, no. 6 Sao Paulo Brazil, 2001.
 25. Chil N., S. Pavón H., H. Galvéz H., C. A. Cuéllar C., B. Avila G. Estudio de algunos parámetros para la caracterización del extracto blando de propóleos procedente de la región de Manzanillo como materia prima para la industria nacional. *Revista cubana de Química*. Vol. XIV, Nº 2, 2002. CAI Rafael Reyes, San Luis, Santiago de Cuba.

26. Quintero-Mora, Londoño-Orozco, *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: 22-26.
27. Peña Raúl C. Estandarización en propóleos: antecedentes químicos y biológicos. Pontificio Universidad Católica de Chile, Facultad de Agronomía e Ingeniería Forestal, Casilla 306-22, Santiago, Chile. Ciencia e Investigación Agraria. 35(1): 17-26. 2008.
28. Bracho J. C., Calidad de propóleos de origen argentino. Propiedades organolépticas. Consultor apícola. Departamento de Química de la Facultad de Ciencias UNALM, Lima, Perú. Noviembre 2003.
29. López del Villar Almira Jessica, Ubillus Celi Maury Milena. Estandarización del propóleos de la provincia de Oxapampa, departamento de Pasco (Perú) como materia prima para su utilización a nivel industrial. Tesis para obtener el título profesional de Químico Farmacéutico. Lima, Perú. 2004
30. Palomino G, *et. al.* Determinación del contenido de fenoles y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos recolectados en el departamento de Antioquia (Colombia). Vitae, vol. 16, Núm. 3, Septiembre de 2009. Pp. 338-395. Universidad de Antioquia, Colombia.
31. Enciclopedia bovina. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México.
http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/e_bovina/04MastitisBovina.pdf
32. Ochoa Z. A., Gutiérrez E. A., Lara Z., L., Loeza L. P., Anaya L., J., López M., J. La prolactina estimula el endocitosis de *Staphylococcus aureus* en epitelio mamario bovino. Vet., Méx., 38 (4), 2007. 455- 465.
<http://www.ejournal.unam.mx/rvm/vol38-04/RVM038000407.pdf>
33. Castillo M., Suniaga J., Rojas G., Hernández J., Caamaño J., Urbina A., Tovar L. Estudio de la prevalencia de mastitis subclínica en la zona alta del estado de Mérida. Instituto de investigaciones Agropecuarias. Facultad de Ciencias

- Forestales y Ambientales. Universidad de los Andes. Agricultura Andina, volumen 16, enero- junio 2009. Pp. 39 – 48.
<http://www.saber.ula.ve/bitstream/123456789/30234/1/articulo3.pdf>
34. Calvinho Luis F., E. E. A. Rafaela, INTA. Control de mastitis causada por *Staphylococcus aureus* a través de segregación. Publicado en Revista Chacra & Campo Moderno. No. 828. Suplemento Tambo, pp. 10-11, 1999.
http://www.inta.gov.ar/rafaela/info/documentos/art_divulgacion/cha828_99.pdf
35. Zecconi Alfonso. Can we eradicate *Staphylococcus aureus* mastitis? XXIV World Buiatrics Congress. 2006, Nice- Francia.
<http://www.ivos.org/proceedings/wbc/wbc2006/zecconi.pdf?LA=1>
36. Ahmed GH, Propolis an overview. <http://www.apinetla.com.ar/congreso/c05.pdf>.
Consultado en octubre 2011
37. Bagdanoy Stefan, Propolis: composition, health, medicine: a review. Enero de 2012. www.bee-hexagon.net/files/file/fileE/health/propolisbookreview.pdf
38. Hegazi, G. A., Composición química y actividad del propóleos. Resumen de la conferencia presentada en el simposium de Apicultura del Mediterráneo. www.vidaapicola.com/tecnica/apiterapia/propoleos.html
39. Neacato V. S, F., Sangolqui. Uso de extractos etanólicos de propóleo para el control de *Staphylococcus aureus* in vitro obtenidos de leche de vacas con mastitis., Ecuador, 2005. <http://repositorio.espe.edu.ec/handle/21000/2593>
40. Tolosa L., Cañizares E. Obtención, caracterización y evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos de Campeche., Facultad de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad Autónoma de Campeche, México. Junio de 2002. <http://farmacia.ugr.es/ars/pdf/233.pdf>.
41. Díaz M. D., Gil R. J., Valdés G. G. Determinación de la CMI de propóleos cubanos a partir de diferentes técnicas., Estación Experimental Apícola. <http://www.bibliociencias.cu/gsd/collect/revistas/index/assoc/HASHa8b7.dir/doc.pdf>. Consultado en Diciembre de 2011.

42. Delgado H., Quijano C. E., Pérez M. I., Quintero M. E. , Catzín V. G. Actividad antimicrobiana del propóleo recolectado por *Apis mellifera* y *Melipona beecheii* b. en el estado de Yucatán. http://www.mexicoapicola.org/contenido/Actividad%20Antimicrobiana_Delgado.pdf . consultado en diciembre de 2011.