



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN**

***“Evaluación del efecto inhibitorio del propóleo sobre  
Nocardia brasiliensis”***

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA**

**P R E S E N T A:**

**MARÍA ISABEL BERNAL HERVER**

**ASESORA: QFB. LETICIA CUBILLO CARRILLO**

**COASESOR: Dr. TONATIUH ALEJANDRO CRUZ SÀNCHEZ**



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

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

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE

ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO  
Jefe del Departamento de Exámenes Profesionales  
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Evaluación del efecto inhibitorio del propóleo sobre *Nocardia brasiliensis*.

Que presenta la pasante: María Isabel Bernal Herver  
Con número de cuenta: 308015173 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica

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

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 07 de Diciembre de 2015.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Q. Mario Arturo Morales Delgado	
VOCAL	Dr. Enrique Salas Téllez	
SECRETARIO	Q.F.B. Leticia Cubillo Carrillo	
1er. SUPLENTE	Q.F.B. Brígida del Carmen Camacho Enriquez	
2do. SUPLENTE	Q.F.B. Olimpia Roxana Ponce Crippa	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

IHM/cga\*

Este trabajo de tesis se realizó en el laboratorio 10 de Microbiología Unidad de Posgrado en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo 1, UNAM.

## ÍNDICE

1. RESUMEN.....	1
2. MARCO TEÓRICO .....	3
2.1 PROPÓLEO .....	3
2.1.1 COMPOSICIÓN QUÍMICA.....	3
2.2 ACTIVIDAD BIOLÓGICA .....	6
2.2.1 Mecanismos de acción antimicrobiana del propóleo.....	7
2.2.2 Actividad antimicótica .....	8
2.2.3 Actividad Antiparasitaria .....	8
2.2.4 Actividad antiviral .....	9
2.2.5 Actividad antiinflamatoria y cicatrizante .....	10
2.2.6 Actividad antioxidante .....	10
2.3 EFECTO ADVERSO .....	11
2.4 <i>Nocardia sp.</i> .....	12
2.4.1 Características generales. ....	12
2.4.2 <i>Nocardia brasiliensis</i> .....	13
2.4.4 ENFERMEDADES PRODUCIDAS POR <i>Nocardia sp.</i> .....	16
2.4.4 ETIOPATOGENIA.....	19
2.4.5 CUADRO CLÍNICO.....	20
2.4.6 DIAGNÓSTICO.....	21
2.4.7 TRATAMIENTO .....	22
2.4.8 EPIDEMIOLOGÍA EN MÉXICO .....	23
3. OBJETIVOS.....	26
Objetivo General. ....	26
Objetivos particulares.....	26
4. HIPÓTESIS.....	27
5. JUSTIFICACIÓN.....	28
6. DISEÑO EXPERIMENTAL .....	29
7. MATERIAL Y MÉTODOS.....	30
7.1 Prueba cualitativa: Método de dilución en placa .....	30
7.3 Material .....	31
8. RESULTADOS .....	32

9. DISCUSIÓN.....	43
10. CONCLUSIONES.....	47
11. RECOMENDACIONES .....	48
12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	49
13. ANEXO.....	55
13.1 Dimetilsulfóxido .....	55
13.2 Susceptibilidad de <i>Nocardia brasiliensis</i> ante algunos antibióticos ..	57

## AGRADECIMIENTOS

Mi primer agradecimiento va dirigido a *dios* por permitirme cumplir una de las metas más grandes en mi vida dándome la fuerza necesaria para poder concluir este objetivo, por mantener a las personas que amo a mi lado y así poder compartir con ellos este logro que también es suyo.

*A mis padres:* por dejarme la herencia más valiosa que cualquier persona puede recibir que es la educación y por el apoyo incondicional que me han brindado en cada etapa de mi vida. Gracias por estar conmigo cuando más los he necesitado y por ejercer esa presión en mí para poder llevar a cabo este proyecto que sin su ayuda definitivamente hubiera sido más difícil. Siempre me han impulsado a salir adelante y no les fallaré. Gracias papás por su amor y su comprensión día a día, son los pilares que sostienen mi vida. Nunca existirán palabras para agradecer todo el esfuerzo y sacrificio que han realizado para poder llevarme a donde hoy me encuentro y para hacerles saber cuán importantes son en mi vida. ¡Gracias infinitas!

A mis hermanos: por ser un ejemplo para mí, por apoyar mis sueños, por cada momento que se han tomado para darme un consejo y hacerme saber que no estoy sola y siempre cuento con ustedes. Gracias hermanos por ser parte de éste logro y siempre les estaré agradecida por todo el apoyo que me han brindado a lo largo de mi vida.

A ti, Ricardo, por compartir conmigo esta etapa de mi vida, donde hubo momentos difíciles, desesperantes pero siempre estabas ahí con las palabras exactas para ayudarme y hacerme ver que vale la pena dar el mayor esfuerzo. Gracias por ayudarme en éste proyecto que aunque desconocías el tema, buscabas la forma de apoyar, muchas gracias. Eres parte importante de mi vida y me da mucho gusto compartir esto contigo.

Agradezco a mi asesora, Leticia Cubillo Carrillo, por guiarme para poder cumplir esta meta, por cada enseñanza y palabras que me hacían mejorar. Muchas gracias por su tiempo y su dedicación para llevar a cabo este proyecto. Agradezco todo el apoyo brindado, los recursos. Muchas gracias, maestra, fue parte fundamental en éste trabajo.



## 1. RESUMEN

El género *Nocardia* está conformado por un grupo heterogéneo de microorganismos aeróbicos aún no totalmente bien caracterizados. Son bacterias Gram positivas, parcialmente ácido alcohol-resistentes o no ácido alcohol-resistentes, filamentosas, que presentan extensa ramificación celular. Existe una variedad de especies de *Nocardia sp.*, este trabajo está enfocado en *Nocardia brasiliensis*, microorganismo que produce la lesión del micetoma (Baeman, 1975).

El micetoma es la micosis profunda más frecuente en México. Es una enfermedad granulomatosa de tipo inflamatorio crónico, que constituye todo un síndrome anatomoclínico, con afección a piel, tejido celular subcutáneo, fascia, músculo e incluso huesos y órganos adyacentes (Arenas, 2002; Dávila, 2001; Soto, 1998).

El micetoma predomina en el sexo masculino en una proporción de 4:1 para todos los agentes causales, excepto para *Actinomyces madurae* donde se invierte la proporción, siendo de 3:2 a favor de la mujer. Es más frecuente entre la segunda y cuarta décadas de la vida, aunque se han reportado casos en niños y ancianos (Bojalil, 2000; Lavalle, 2008; Soto, 1998; Welsh, 1991).

Los campesinos y las amas de casa del área rural son los más afectados, ya que están más expuestos a los agentes etiológicos del micetoma, debido a la falta de uso de zapatos y por las actividades que realizan en el campo.

El objetivo de este proyecto fue probar si existía inhibición del agente etiológico causante del micetoma más común en México, probando diferentes concentraciones de propóleo y así poder proponerlo como un posible tratamiento alternativo para esta actinomicosis.

Para cumplir el objetivo se realizaron las siguientes pruebas: Método de dilución en placa, sensibilidad por macrodilución en caldo, prueba cualitativa y cuantitativa respectivamente.

Al realizar la prueba cualitativa se observó que el propóleo inhibía a *Nocardia brasiliensis*. A pesar de no ser ésta una prueba cuantitativa arrojó resultados que indicaban que el propóleo probado efectivamente inhibía la cepa con la que se trabajó. Posteriormente en la prueba cuantitativa se encontró que la concentración a la que el propóleo logra inhibir a *Nocardia brasiliensis* es de 4 mg/mL.

Con este trabajo se abre el panorama para la realización de futuros estudios en relación al tratamiento con propóleo para contrarrestar la lesión del micetoma, actinomicosis causada por *Nocardia brasiliensis*.

## **2. MARCO TEÓRICO**

### **2.1 PROPÓLEO**

El propóleo es el nombre genérico que se le da a la 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, disminuyendo así la entrada del viento, lluvia y frío, también lo emplean para reducir el tamaño de la entrada a la colmena, para cerrar grietas o para embalsamar pequeños animales muertos dentro de la misma, los cuales las abejas no pueden sacar debido a su tamaño y peso. El propóleo es también responsable de la sanidad de los panales, en especial contra microorganismos. (Estrada, 2012; Peña, 2008).

El término propóleo o própolis deriva del griego “pro” que significa en defensa de; y “polis” que significa ciudad o colmena, haciendo referencia al uso que le dan las abejas al colocarlo en los accesos a la colmena (Gutiérrez, 2011).

#### **2.1.1 COMPOSICIÓN QUÍMICA**

En las últimas tres décadas un gran interés ha surgido en relación a la composición química y actividades terapéuticas del propóleo por lo que ha sido objeto de numerosos estudios químicos y farmacológicos.

La composición química del propóleo es compleja y depende de varios factores como son: la región geográfica, el clima, el relieve, la vegetación natural y las cuencas hidrográficas entre otros. La vegetación que rodea a la colmena es de importante consideración ya que es a la que recurren las abejas. Algunos ejemplos de estas fuentes vegetales son: pino, abeto, sauce,

abedul, varias especies de álamo, fresno, roble entre muchos otros que encuentren cerca de sus colmenas. Es por esto que los propóleos de diferentes zonas geográficas poseen efectos similares pero difieren en su composición (López, 2012).

Entre estos componentes encontramos ceras, resinas, bálsamos, aceites esenciales, aminoácidos y azúcares. El propóleo es rico en elementos inorgánicos, algunos de ellos involucrados en los sistemas enzimáticos fundamentales, podrían estar asociados con sus actividades biológicas. Llama la atención la prevalencia de flavonoides como pinocembrina, galangina, pinobanskina y el ester feniletílico del ácido caféico entre otros compuestos derivados del ácido cinámico, a los cuales se asocia la actividad biológica del propóleo. En la tabla 1 se muestran los componentes más significativos del propóleo (Gutiérrez, 2011).



Imagen 1. Propóleo utilizado para este proyecto, proveniente de FESC Campo 4. .  
Imagen tomada en el Laboratorio 10 de Microbiología, Unidad de Posgrado de FESC  
Campo 1 UNAM.

## Composición química del propóleo.

COMPONENTES	EJEMPLOS
Ácidos orgánicos	Ácido benzoico $C_6H_5-COOH$ , gálico $C_7H_6O_5$
Ácidos fenólicos	Ácidos cafeico $C_9H_8O_4$ , cinámico, pumarínico, insofenílico y fenólico
Aldehidos aromáticos	Vainillina $C_8H_8O_3$ , isovainillina $C_8H_8O_3$
Cumarinas	Esculetol, escopuletol
Flavonoides	Pinocembrina $C_{15}H_{12}O_4$ , galangina $C_{15}H_{10}O_5$ , pinobanksina $C_{15}H_{12}O_5$
Flavonas	Acetina $C_{16}H_{12}O_5$ , cressina amarilla, pectolinaringenina $C_{17}H_{14}O_6$ , tectocrisina $C_{16}H_{12}O_4$
Flavonoles	Izalquinina, kaempférido $C_{16}H_{12}O_6$ , quercetina $C_{15}H_{10}O_7$ , remnocitrina.
Flavononas	Pinostrobin $C_{16}H_{14}O_4$ , sakuranetin $C_{16}H_{14}O_5$ .
Flavononoles	Pinobanksina, ferúlico, los sesquiterpenos y las flavononas (principalmente las galanginas $C_{15}H_{10}O_5$ )
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

Tabla 1.-Principales componentes químicos del propóleo de FESC-C4 (Gutiérrez, 2011).

Las propiedades terapéuticas del propóleo dependen de la calidad de éste así como de las proporciones de los elementos que lo constituyen y no sólo de una sustancia en particular, estos compuestos se relacionan directamente con su origen geográfico.

Los compuestos identificados en propóleos de colmenas ubicadas en emplazamientos cercanos entre sí no difieren significativamente, aunque desde el punto de vista cuantitativo pueden ser variables. Ello implica que los propóleos deban ser estudiados en función de la zona geográfica de ubicación de las colmenas (Gutiérrez, 2011).

## **2.2 ACTIVIDAD BIOLÓGICA**

La bibliografía reporta un gran número de trabajos relacionados con la actividad biológica y farmacológica del propóleo; sin embargo, la cantidad de estudios que reportan compuestos puros con actividad específica obtenidos de este material es muy reducida, y las aplicaciones son muy diversas y heterogéneas. Diversos investigadores han reportado que el propóleo posee diversas actividades biológicas, entre las cuales destacan las siguientes:

- Actividad Antibacteriana
- Actividad Antimicótica
- Actividad Antiparasitaria
- Actividad antiinflamatoria
- Actividad cicatrizante
- Actividad anestésica
- Actividad antioxidante
- Actividad Inmunomoduladora
- Actividad antitumoral
- Actividad vasoprotectora

### 2.2.1 Mecanismos de acción antimicrobiana del propóleo

Se ha demostrado que la actividad antimicrobiana de propóleos es debido al sinergismo de sus componentes y no de un solo componente. Los flavonoides y los compuestos fenólicos se consideran como los principales componentes bioactivos de los propóleos. Los flavonoides: pinocembrina, galangina y pinobanksina se les atribuye la mayor actividad bacteriostática y bactericida (Estrada, 2012; Gutiérrez, 2011).

El ácido cinámico y algunos flavonoides son los responsables de desacoplar la transducción de energía de la membrana plasmática inhibiendo la motilidad bacteriana. Así mismo se ha determinado que el propóleo desorganiza la membrana citoplasmática, la pared celular y el citoplasma provocando una bacteriólisis parcial acompañado de inhibición en la síntesis de proteínas.

En lo que se refiere a la galangina se sabe que provoca un incremento considerable en la pérdida de potasio lo cual se atribuye al daño ocasionado 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. Se ha determinado que la quercetina inhibe la ADN girasa de manera parcial (Gutiérrez, 2011).

El propóleo es el producto de abeja con la mayor actividad antimicrobiana, la cual ha sido confirmada por numerosos estudios científicos, se ha demostrado su actividad en contra de múltiples microorganismos tales como: *Bacillus cereus*, *Mycobacterium sp.*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus viridans*, *Staphylococcus epidermidis*, *E. coli*, *Helicobacter pylori*, *Aspergillus sp.*, *Cryptococcus neoformans* y *Proteus vulgaris* (Estrada, 2012).

### 2.2.2 Actividad antimicótica

Las propiedades antimicóticas del propóleo han sido establecidas por numerosos autores, luego de considerar a compuestos como: pinocebrina, galangina, ácido benzoico, ácido salicílico, vainillina, mono y sesquiterpenos; como los principales compuestos responsables de esta actividad debido a sus propiedades fungicidas.

Mediante el estudio de la actividad antifúngica de los propóleos de diferentes áreas geográficas, varios autores han encontrado que presentan efectos antifúngicos en diversos grados en muchas especies como:

*Candida albicans*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Malassezia pachydermatis*, *Aspergillus niger*, *Alternaria alternaria*, *Penicillium digitatum* y *Plasmopara vitícola* (Palomino *et al.*, 2010).

Aunque muchos estudios se han centrado en demostrar la actividad antifúngica de diferentes extractos de propóleos, pocos han reportado sus efectos sobre la morfología y estructura de los hongos. Un estudio realizado en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, de la UNAM en el laboratorio de Microbiología de la Unidad Multidisciplinaria, ha reportado que el Extracto etanólico del Propóleo a concentraciones de 0.25 mg/mL, indujo la inhibición de la formación de tubos germinales así como la deformación de algunas levaduras (Estrada, 2012).

### 2.2.3 Actividad Antiparasitaria

Se ha reportado una acción antiparasitaria del propóleo, destacándose sus efectividad frente a *Giardia lamblia*. En un estudio realizado por Hollands valoraron la actividad de diferentes extractos alcohólicos de propóleo sobre trofozoitos de *Giardia lamblia*, y pudieron constatar un efecto antigiardiasico en solo 24 horas, tras observar, además de la inhibición del crecimiento empleando una concentración de



Extracto etanólico de Propóleo de 11.6 mg/mL con un porcentaje del 98% de inhibición la aparición de un gran número de estos parásitos redondeados e inmóviles como evidencia de muerte.

Por otra parte, también se han realizado estudios in vitro contra *Trichomonas vaginalis* empleando soluciones de Extracto etanólico de Propóleo a una concentración de 150 mg/mL presentando una actividad letal para este parásito (Palomino *et al.*, 2010).

#### **2.2.4 Actividad antiviral**

En los últimos años un volumen cada vez más extenso de esfuerzos se ha dirigido a las investigaciones sobre los múltiples aspectos vinculados a la acción antiviral del propóleo. Se ha demostrado que la serie de componentes de naturaleza flavonoide revela una actividad antiviral; en particular tres compuestos presentes: apígenina, acacetina y pectolinarígenina.

Saiz y colaboradores en el 2002, reportaron que uno de los principios activos aislados cromatográficamente del propóleo denominado éster feniletílico del ácido cafeíco (CAPE) presenta actividad en la transformación viral causada por Adenovirus tipo 5, sin afectar a las células normales.

También se han empleado para otros fines, Bojnansky y Kosljarova (1975) estudiaron los efectos inhibitorios de una solución de propóleos al 10% frente a tres especies de virus; causantes del mosaico del pepino, de la mancha del tabaco y de la necrosis del tabaco, los autores concluyeron que la sensibilidad más elevada correspondió al virus de la necrosis del tabaco, evidenciándose para el virus del mosaico del pepino una sensibilidad más reducida (Estrada, 2012; Gutiérrez 2011).

### **2.2.5 Actividad antiinflamatoria y cicatrizante**

Existen diversas investigaciones que indican que el propóleo tiene propiedades reconstructivas y de cicatrización de heridas. et al y Asis (1989) consideran que la capacidad de acelerar ostensiblemente la epitelización y división celular en la curación de heridas, la prevención y detención del desarrollo de procesos inflamatorios está relacionada con las flavonas, principalmente glucósidos que aparecen en el propóleo en forma de agliconas libres y los metoxiflavonoides respectivamente. Su intervención se cree está fundamentada a que estos compuestos tienen actividad a nivel de los mediadores de la inflamación.

Otros autores reportan que el propóleo presenta un efecto antiinflamatorio sobre la piel. Ivanovska et. al (1995) observó una significativa reducción de la inflamación aguda en ratones, administrada por vía oral a una dosis de 150 mg/kg. Later, Krol et al. Han estudiado 19 compuestos fenólicos que presentan actividad antiinflamatoria, entre los que se encuentran: ácido salicílico, ácido gálico, ácido cinámico, ácido o-cumárico, ácido 3,4-dimetoxicinamico, galanina, entre otros.

Por su parte, Sthehl y colaboradores consideran, que los extractos acuosos y etanólicos del propóleo han indicado una sustancial actividad antiinflamatoria. Sus estudios revelan que uno de los mecanismos de acción de este producto puede relacionarse con la inhibición de la enzima hidfolato reductasa, posiblemente por actividad del ácido cafeico presente en el propóleo (Estrada, 2012; Gutiérrez 2011; Palomino *et al.*, 2010).

### **2.2.6 Actividad antioxidante**

Hoy en día nos enfrentamos con diversos factores predisponentes que aceleran la aparición de trastornos como: trastornos cardiovasculares, reumatismo, diabetes, padecimientos cerebrovasculares, cáncer, así como envejecimiento prematuro.

Algunos agentes externos capaces de producir radicales libres tales como las radiaciones, rayos ultravioleta, exposición al sol, metales tóxicos, el ozono, etc. Estas moléculas atacan los lípidos como grasas insaturadas, provocan reacciones de peroxidación que darán lugar a la formación de otros radicales libres. El organismo lucha de forma natural contra estos elementos dañinos, y para ello produce las enzimas superóxidasas dismutasa y glutatión peroxidasa, las cuales se encargan de bloquear su formación o su destrucción una vez formados. Estudios revelan que algunos antioxidantes como las vitaminas A, C y E, selenio y zinc algunos de estos elementos presentes en el propóleo intervienen directamente destruyendo los radicales libres o estimulando la liberación y potencializando su acción o interviniendo en sus síntesis (Estrada, 2012).

### **2.3 EFECTO ADVERSO**

La actividad alérgica del propóleo es desconocida, sin embargo ha demostrado ser capaz de provocar reacciones de sensibilización en algunas personas, al manipularlo o utilizarlo en la terapéutica. Se ha visto en apicultores profesionales el padecimiento de una dermatosis específica a esta profesión. Las regiones que más se afectan son las manos y ciertas zonas que entran en contacto con el propóleo, como la cara y el cuero cabelludo. En otras personas estas manifestaciones pueden presentarse de varias formas, desde crisis asmáticas (por inhalación del propóleo) hasta un exantema urticario papuloso generalizado al aplicarse tópicamente, para desaparecer poco tiempo después de eliminar el contacto con el producto.

La diversidad en la composición química de este producto apícola y su empleo generalizado en la industria, ha traído como consecuencia la necesidad de su control de calidad y normalización. Con este fin, se han desarrollado metodologías de trabajo establecidas por diferentes normas internacionales, entre las que se

incluyen la norma IRAM-INTA del Instituto Argentino de Normalización-Subcomité de productos agroalimentarios del NOA (2004), la norma Ramal del Ministerio de Agricultura de Cuba (1994), y el reglamento técnico para la fijación del identidad y calidad del propóleos de Ministerio de Agricultura de Brasil (Palomino *et al.*, 2010).

## **2.4 *Nocardia* sp.**

### **2.4.1 Características generales.**

El género *Nocardia* está conformado por un grupo heterogéneo de microorganismos aeróbicos aún no totalmente bien caracterizados. Son bacterias Gram positivas, parcialmente ácido alcohol-resistentes o no ácido alcohol-resistentes, filamentosas, que presentan extensa ramificación celular. Los filamentos ramificados fragmentan dentro de las células pleomórficas variando de formas cocoides a bacilares u organismos semejantes a *Corynebacterium*. Si no son observadas cuidadosamente pueden ser fácilmente confundidas con otros organismos. Son aeróbicos y pueden ser muy difíciles de diferenciar de *Mycobacterium*, género con el cual están filogenéticamente relacionadas. Pueden ser diferenciados de *Actinomyces* y *Streptomyces* con base en un análisis de pared celular. Las paredes celulares de *Nocardia*, *Mycobacterium* y *Corynebacterium* son muy similares (Baeman, 1975).

La morfología microscópica varía de formas que producen un crecimiento esparcido debido a la temprana división en fragmentos cocoides y/o bacilares, a aquellas en las cuales la fragmentación es retenida, permitiendo una abundante producción de micelio. Los filamentos ramificados pueden ser encontrados en la mayoría de los cultivos; pero no son comunes en cultivos viejos de algunas especies. Los miembros del género pueden ser divididos en 3 grupos morfológicos de acuerdo al grado de desarrollo que muestran (Azuma *et al.*, 1975; Beaman, 1975; Bojalil, 1999; Conde *et al.*, 1982).

Grupo I: los miembros de este grupo tienen una cantidad limitada de crecimiento debido al inicio de la fragmentación en el centro de la colonia después de 2-14 horas de incubación. La textura de la colonia es blanda, butirosa o mucosa.

Grupo II: en los miembros de este grupo la fragmentación es retardada de 18-20 horas, así que se da una ramificación extensiva del crecimiento. La textura de las colonias tiende a ser escamosa, pastosa o con una superficie mate.

Grupo III: en los miembros de este grupo la fragmentación es a menudo retardada por varios días permitiendo un abundante crecimiento, el cual se puede fragmentar en elementos cocoides y bacilares (McClung, 1989).

#### **2.4.2 *Nocardia brasiliensis***

Filamentos ramificados formando un crecimiento extensivo sobre la mayoría de los medios, alrededor de 1µm de diámetro. La fragmentación empieza en el centro de la colonia después de alrededor de 4 días de incubación y produce células bacilares y cocoides irregulares. El crecimiento es de color amarillo-anaranjado a café con hifa aérea delgada y blanca sobre la superficie. Las colonias son granulares, acumuladas, convolutas. Producen un exopigmento amarillo pardo sobre la mayoría de los medios orgánicos (Azuma et al., 1975; Baeman, 1975; Bojalil, 1999).

Grupo morfológico III. Ácido alcohol-resistente.

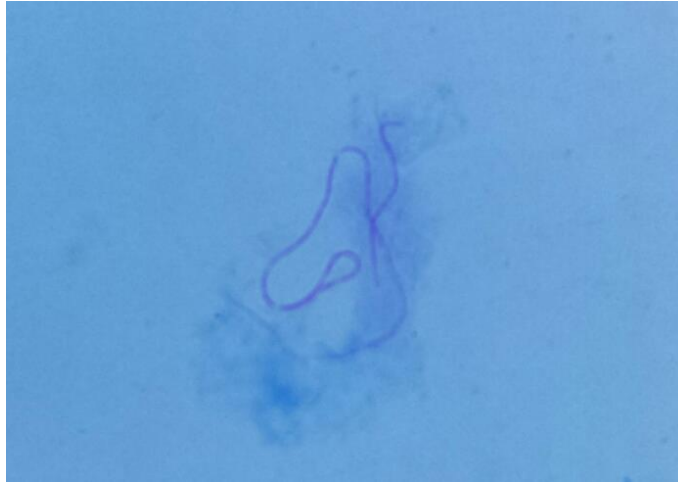


Imagen 2. Tinción de Ziehl-Neelsen de la cepa de *Nocardia brasiliensis*, donde se observa parcialmente ácido alcohol-resistente. . Imagen tomada en el Laboratorio 10 de Microbiología, Unidad de Posgrado de FESC Campo 1 UNAM.

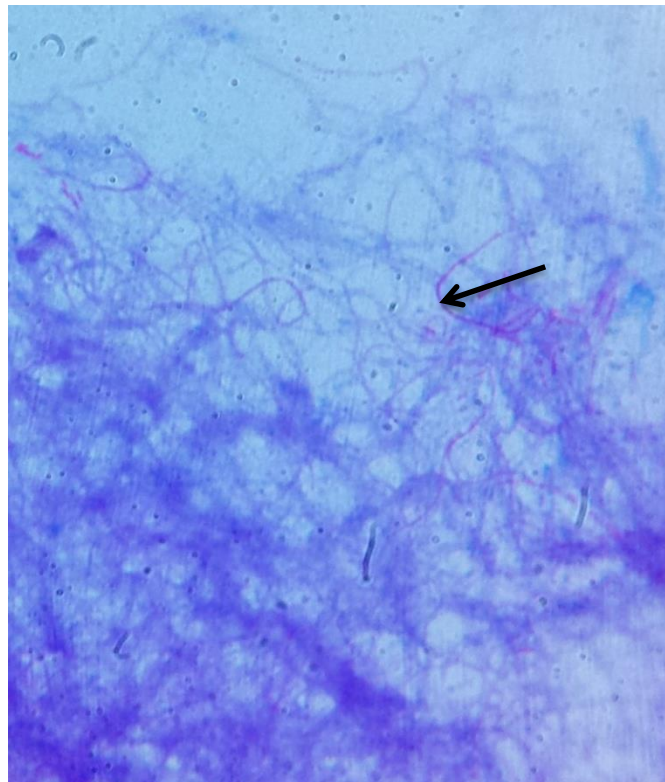


Imagen 3. Tinción de Ziehl-Neelsen de la cepa de *Nocardia brasiliensis*, se observan filamentos parcialmente ácido alcohol-resistentes. . Imagen tomada en el Laboratorio 10 de Microbiología, Unidad de Posgrado de FESC Campo 1 UNAM.

Las colonias en agar nutritivo son de color anaranjado sucio, granulares, acumuladas y blancas en los bordes.

Sobre agar nitrato glicerol las colonias son acumuladas, de color coral con un crecimiento escaso en los márgenes.

Sobre agar extracto de levadura glucosa, las colonias son de color amarillo a naranja o color tostado (canela), elevadas, plegadas. Un pigmento soluble amarillo es producido en cultivos viejos.

Crecimiento anaranjado tostado, seco, granulado, escaso y blanco sobre un pedazo de papa (McClung, 1989).

Fermentan la arbutina, la D-arabinosa, la D-fructosa, la D-galactosa, el DL-inositol, la glucosa, el glicerol, el manitol, la manosa, el sorbitol y la trealosa. Hidroliza la esculina, la caseína, la gelatina, la guanina, la hipoxantina, la queratina, la tirosina y la urea, sin producción de gas. Las siguientes sustancias sirven como únicas fuentes de carbón y energía: el acetato, el butirato, el citrato, la D-fructosa, la D-galactosa, la glucosa, el inositol, el malato, la maltosa, el manitol, la manosa, la parafina, la L-prolina, el propionato, el piruvato, el ácido sebácico, el sorbitol y el succinato (Ortíz et al., 1979).

Coagulan en forma lenta a la leche tornasolada, seguida de peptonización alcalina, con producción de película amarillo-naranja. Reducen el nitrato.

Rango de temperatura: 10-45°C, no crece a 50°C. Rango de pH: 6.0-9.0. Crece bien en solución de cloruro de sodio al 5%. Se inhibe en solución de cloruro de sodio al 7%. No sensible a penicilina (discos de 5UI). Resistente a la lisozima.

Produce gránulos multilobulados en ratones blancos, cobayos y conejos. El contenido de G + C del ADN varía de 67 - 68 % (McClung, 1989; Ortíz et al., 1979).

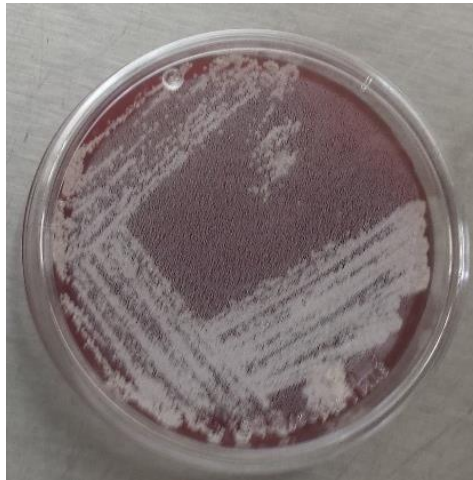


Imagen 4. Crecimiento de *Nocardia brasiliensis* en medio Agar Sangre. Imagen tomada en el Laboratorio 10 de Microbiología, Unidad de Posgrado de FESC Campo 1 UNAM.

#### 2.4.4 ENFERMEDADES PRODUCIDAS POR *Nocardia sp.*

##### **NOCARDIOSIS**

La nocardiosis es una infección bacteriana aguda, subaguda o crónica, localizada (piel, pulmones, cerebro) o diseminada (cuerpo entero). Principalmente es causada por la especie de *Nocardia asteroides*.

Afecta más a hombres que a mujeres (hombre-mujer de 3:1). La nocardiosis puede aparecer a cualquier edad, pero es más frecuente en adultos de mediana edad. Las manifestaciones clínicas dependen del lugar de infección. La mayoría de los pacientes presentan enfermedad pulmonar. Los signos frecuentes son: fatiga, fiebre, escalofríos, tos (similar a la tos en la neumonía o la tuberculosis), disnea, dolor torácico pleural y pérdida de peso.

La nocardiosis cutánea primaria se puede presentar en forma de infección cutánea, linfocutánea o subcutánea. La infección cutánea se manifiesta por: celulitis, pústulas, pioderma, paroniquia, ulceraciones o abscesos localizados. En la infección linfocutánea se observan lesiones similares, pero están asociadas a una



linfadenopatía regional ascendente. La infección subcutánea se manifiesta por la aparición de micetoma, que afecta predominantemente a las extremidades. La nocardiosis diseminada afecta principalmente a individuos inmunocomprometidos y conduce con frecuencia a lesiones cerebrales o meníngeas.

La nocardiosis se asocia habitualmente a un historial de traumatismo (heridas punzantes o arañazos de gatos), inmunodeficiencia, resistencia a una terapia con antibióticos precedente, o fiebre (Bojalil, 1999).

## **MICETOMA**

El micetoma es una enfermedad causada principalmente por *Nocardia brasiliensis*. Fue descrito por primera vez por John Gill en 1842, en la zona de Madura; en India, años más tarde fue llamada “Pié de Madura” por Colebrook. Hacia el año de 1860, Carter determinó que la etiología del mismo era fúngica, y propuso el término micetoma (que significa “tumor por hongos”). En 1913 Pinoy dividió a los agentes causales en dos grupos: actinomicetomas y eumicetomas. En nuestro país, el primer caso fue descrito por Cicero en 1902.

El micetoma es la micosis subcutánea más frecuente en México. Es una enfermedad granulomatosa, de tipo inflamatorio crónico, que constituye todo un síndrome anatomoclínico, con afección a piel, tejido celular subcutáneo, fascia, músculo e incluso huesos y órganos adyacentes (Arenas, 2012; Dávila, 2001; Soto, 1998).

Predomina en el sexo masculino en una proporción de 4:1 para todos los agentes causales, excepto para *Actinomadura madurae* donde se invierte la proporción siendo de 3:2 a favor de la mujer. Es más frecuente entre la segunda y cuarta décadas de la vida, aunque se han reportado casos en niños y ancianos (Bout, 2000; Lavallo 2008).

Los campesinos y las amas de casa del área rural son los más afectados, ya que están más expuestos a los agentes etiológicos del micetoma, debido a la falta de uso de zapatos y por las actividades que realizan en el campo.

Existen por lo menos 20 especies de actinomicetos y hongos superiores que pueden provocar micetomas, siendo los más frecuentes *Actinomyces*: *Nocardia brasiliensis* y *Actinomadura*.

En México predominan los causados por actinomicetos (97.2%), siendo el resto causado por eumicetos (2.8%).<sup>8</sup> El género *Nocardia* es el más frecuente (85.65%) de los actinomicetos seguidos por el *Actinomadura* (10.2%) y *Streptomyces* (1.5%). El primer lugar como agente causal del micetoma en México (71.1%) lo ocupa *Nocardia brasiliensis*, *Nocardia asteroides* (0.4%) y *Nocardia otitidis cavium* (0.25%). Le sigue en frecuencia el género *Actinomadura*, principalmente *Actinomadura madurae* (10%), *Actinomadura pelletieri* (0.2%) (Muñoz et al., 2000; Novales, 1995; Soto, 1998).

Clínicamente se observa aumento de volumen, deformación de la región y abundantes orificios fistulosos, por los que drena un líquido filante, seropurulento que contiene “granos”; en muchas ocasiones el orificio de salida presenta un reborde mamelonado, carnoso y en el fondo hay una depresión, pueden encontrarse ulceraciones y costras melicéricas. También aparecen cicatrices retractales, fibrosas, hipopigmentadas o hiperpigmentadas. La evolución es lenta, pero inexorable, sin regresión espontánea de la enfermedad (Lavalle, 2008; Novales, 1995; Welsh, 1991).



Imagen 5. Micetoma podal causado por *Nocardia brasiliensis* (Imagen izquierda), micetoma en tronco de una mujer donde se observa la lesión granulomatosa (imagen derecha). Imágenes tomadas de: <http://lya.fcien.unam.mx>.

#### 2.4.4 ETIOPATOGENIA

*Nocardia brasiliensis* es una bacteria que pertenece al orden Actinomycetales, familia *Nocardiaceae* y género *Nocardia*. El género *Nocardia* está filogenéticamente relacionado con otros géneros bacterianos como: *Mycobacterium*, *Corynebacterium*, *Gordonia*, *Rhodococcus* y *Tsukamurella*. *Nocardia brasiliensis* es un bacilo aerobio, intracelular facultativo, no móvil, Gram positivo y parcialmente ácido-alcohol resistente. Produce filamentos ramificados tanto en cultivos como en los tejidos, que al microscopio se observan como filamentos microsifonados (0.5-1  $\mu\text{m}$ ), que se fragmentan en formas cocoides y bacilares (McNeil, 1994; Williams et al., 1989).

Tiene una pared celular semejante a las micobacterias, compuesta de: peptidoglicano, arabinogalactano y ácidos nocardiomicólicos. Los agentes causales viven como saprofitos en la naturaleza, en el suelo o los vegetales; se introducen a la piel de los seres humanos a través de algún traumatismo, casi siempre por una espina vegetal, pero es posible que lo hagan con astillas de

madera, piedras o instrumentos metálicos contaminados con tierra que contiene la bacteria. Después de la infección, los microorganismos emiten filamentos en los tejidos y como una forma de resistencia, se aglomeran en colonias más o menos compactas, denominadas “granos”, que se eliminan en una secreción mucosa a través de fístulas. El color de estos “granos” nos permite orientarnos hacia el diagnóstico del posible agente causal. Si los granos son de color rojo su agente causal probable es actinomiceto, si son de color negro, es de origen micótico, y si son de color blanco o amarillento se le debe de realizar un estudio histológico y microbiológico para tener una mayor certeza. El mecanismo exacto por el cual el hospedero con inmunidad íntegra responde ante el micetoma, no está bien establecido, pero se ha visto que en los tejidos alrededor del grano hay una reacción supurativa, formada principalmente por polimorfonucleares (PMN), fibrosis, neoformación vascular (Curry, 2000; Daoud et al., 2005; Williams et al., 1989).

En los eumicetos la reacción es de tipo granulomatosa. El daño en ambos, se extiende por contigüidad. En la última fase de invasión puede afectar tendones, nervios, vasos sanguíneos o linfáticos. Se han reportado casos de micetomas en pacientes con tratamiento inmunosupresor, debido a una menor respuesta del sistema inmune (Curry, 2000).

#### **2.4.5 CUADRO CLÍNICO**

El periodo de incubación puede durar desde algunas semanas hasta años. El sitio más afectado son las extremidades inferiores (64%) o superiores (14%). El sitio tiene relación directa con el sitio de inoculación. El cuadro clínico se caracteriza por aumento de volumen, deformación de la región y abundantes orificios fistulosos, sitio de salida de un exudado filante o seropurulento, donde se encuentran los llamados “granos”. La evolución es lenta sin regresión espontánea.

Los pacientes no presentan alteración del estado general, aunque las lesiones sean muy grandes. En el laboratorio solo presentan una mínima leucocitosis (10,000-15,000), neutrofilia, aumento de la velocidad de sedimentación globular y en algunos casos anemia microcítica hipocrómica (González, 1985).

Determinar la especie del organismo infectante puede ser de utilidad para definir el curso de la enfermedad y elegir el tratamiento más indicado, además de que existe diferente patogenicidad entre las diversas especies de este género (Conville et al., 2000).

#### **2.4.6 DIAGNÓSTICO**

El diagnóstico se establece por cultivo de las muestras clínicas de los órganos afectados. La tinción de Gram muestra bacilos Gram positivos filamentosos ramificados o formas bacilares y cocoides. Son parcialmente ácido-alcohol resistentes, con lo que se tiñen con la tinción de Kinyoun o Ziehl-Neelsen modificada (Conville et al., 2007).

*Nocardia* es un microorganismo de crecimiento lento que crece bien entre 3-7 días para la mayoría de las especies en medios convencionales, como agar sangre, y en medios específicos enriquecidos como Sabouraud, Lowestein-Jensen, BCYE o Thayer Martin. Los cultivos se incuban a 32-37 °C en atmósfera de CO<sub>2</sub>. Las colonias son de aspecto variable, opaco, seco y rugoso, de superficie irregular y aspecto característico de yeso. La mayoría son pigmentadas, de color blanco, rojo, rosa o anaranjado, tienden a incrustarse en la superficie del agar y presentan un olor característico a tierra húmeda. Es aerobio estricto, inmóvil, de crecimiento lento, productor de catalasa y ureasa, y resistente a lisozima (Conville et al., 2007).

La distinción de las especies de *Nocardia* puede efectuarse por pruebas bioquímicas, como la descomposición de caseína, xantina, hipoxantina y tirosina. También por la sensibilidad a antibióticos, la temperatura de cultivo, la resistencia

al fluorouracilo, la positividad de la arilsulfatasa a las 2 semanas, o la lisis inducida por algunas levaduras.

También se pueden identificar por la composición de los ácidos micólicos de la pared celular mediante cromatografía de gases y el análisis por HPLC. Por último, las técnicas de genética molecular, como son el estudio de polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) o la secuenciación genómica del ARNr 16S, son muy útiles para la identificación definitiva, aunque no están al alcance de todos los laboratorios (Bennet, 1988; Conville et al., 2007).

#### **2.4.7 TRATAMIENTO**

Existen diferentes tratamientos para el micetoma. El micetoma actinomicético es tratado de primera instancia con trimetoprim/sulfametoxazol (SXT) 8/40 mg/Kg/día; con este esquema terapéutico se obtiene una tasa de curación del 70%.

Otras opciones terapéuticas incluyen el uso de: amoxicilina/ácido clavulánico, sulfonamidas, diaminodifenilsulfona (DDS); las complicaciones más importantes con este medicamento son las metahemoglobinemia y anemia hemolítica (Arenas, 2012; Bennet, 1988).

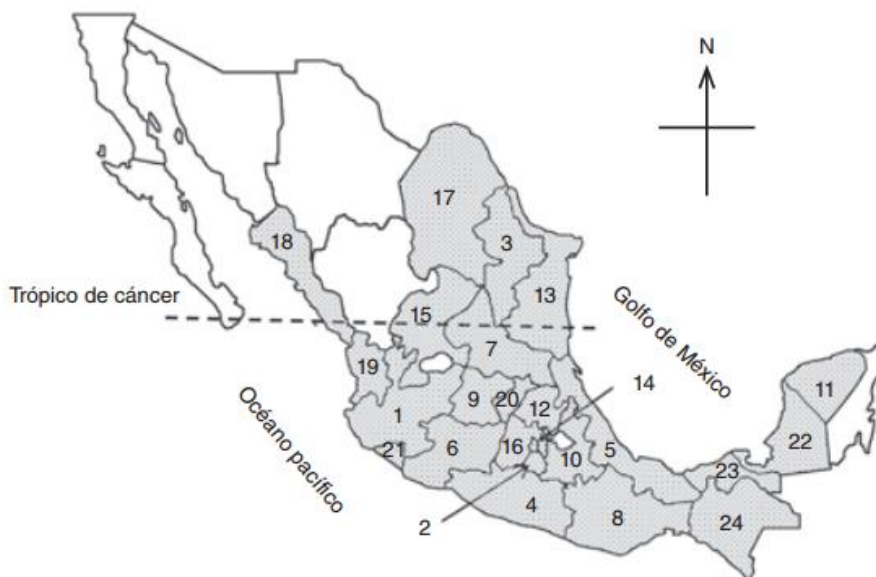
En caso de no presentarse respuesta al tratamiento, se pueden administrar esquemas alternos como: SXT en combinación con DDS (1.5 mg/Kg/día) vía oral (VO), en dosis única (DU) o estreptomina 15 mg/Kg IM DU. En casos de micetomas extensos, con afección ósea, con tendencia a diseminarse, con pobre respuesta al tratamiento administrado o en casos recalcitrantes, se usa SXT con amikacina. Se administra SXT 8/40 mg/Kg/día por 5 semanas y amikacina 15 mg/Kg/día por 3 semanas. Esto es considerado un ciclo y se obtiene una cura de hasta del 95%. Este ciclo se puede repetir en 3-5 ocasiones. Entre cada ciclo se requiere verificar al paciente con audiometría y depuración de creatinina. Se han estado realizando estudios para encontrar nuevos medicamentos que puedan servir

para estos pacientes y se ha observado que las oxazolidinonas como el linezolid muestra buena respuesta, obteniendo una CMI más baja que la amikacina (Bennet, 1988; Conde et al., 1982).

Existe un reporte de un paciente con Nocardiosis por *Nocardia transvalensis* con linfopenia, resistente a sulfas, aminoglucósidos y quinolonas. Se le dio linezolid 600 mg/día por 3 meses, obteniendo curación. Existen reportes de Nocardiosis en los que se probaron las CMI de CIP, SPX, amikacina, SXT, minociclina, imipenem y se observó que algunas eran efectivas, pero se observaron efectos sinergistas de amikacina con SXT, minociclina, imipenem y SPX. Se ha descubierto también que existe una nueva droga DA-7867, la cual tiene efecto contra *Nocardia brasiliensis* y presenta una buena respuesta, con una CMI del 90% con 0.03 µg/mL y del 50% con 0.06 µg/mL, se han hecho estudios in vitro e in vivo (Arenas, 2002; Bennet, 1988; Conde et al., 1982).

#### **2.4.8 EPIDEMIOLOGÍA EN MÉXICO**

La distribución geográfica del micetoma según estudios realizados en el año 2012 en México, fue muy amplia, ya que en 24 de los 31 estados que forman la República Mexicana se reportaron casos. En total hubo 3,933 casos, de los que 3,471 se reportó en el lugar de origen. El mayor número de casos correspondió a los siguientes estados: Jalisco (676 casos), Morelos (429 casos), Nuevo León (347 casos), Guerrero (302 casos) y Veracruz (264 casos) (Fig. 1).



Estado	Casos	Estado	Casos	Estado	Casos	Estado	Casos	Estado	Casos
(1) Jalisco	676	(6) Michoacán	243	(11) Yucatán	94	(16) Edo. de México	44	(21) Colima	13
(2) Morelos	429	(7) San Luis Potosí	229	(12) Hidalgo	67	(17) Coahuila	36	(22) Campeche	9
(3) Nuevo León	347	(8) Oaxaca	172	(13) Tamaulipas	66	(18) Sinaloa	34	(23) Tabasco	6
(4) Guerrero	302	(9) Guanajuato	163	(14) Distrito Federal	49	(19) Nayarit	24	(24) Chiapas	3
(5) Veracruz	264	(10) Puebla	138	(15) Zacatecas	49	(20) Querétaro	14	Sin reportar	462

Figura 1. Distribución geográfica de 3,933 casos de micetoma. Imagen tomada de la Gaceta Médica de México. 2013; 149:586-92.

En la figura 2 se muestra que, de los 3,933 casos de micetoma reportados, el actinomicetoma se presentó en 3,796 (96.52%) y el eumicetoma en 137 (3.48%).

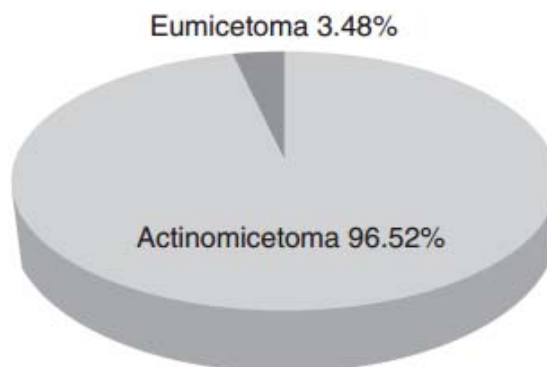


Figura 2. Tipos de micetoma en 3,933 casos. Imagen tomada de la Gaceta Médica de México. 2013; 149:586-92.



Agentes de actinomicetoma; *Nocardia brasiliensis* fue el actinomiceto más frecuente en esta casuística, observándose en 2,489 casos (65.58%), seguida de *Actinomadura madurae* con 301 casos (7.93%). Otras especies identificadas con mucho menor frecuencia fueron *N. asteroides* con 27 casos y dos casos de una especie de reciente descripción (*N. harenae*) Tabla 2 (López et al., 2013).

Tabla 2. Agentes de actinomicetoma en 3,796 casos.

<b>Agente</b>	<b>n.º</b>	<b>%</b>
<i>Nocardia brasiliensis</i>	2,489	65.58
<i>Actinomadura madurae</i>	301	7.93
<i>Streptomyces somaliensis</i>	39	1.02
<i>Nocardia asteroides</i>	27	0.71
<i>Actinomadura pelletieri</i>	11	0.29
<i>Nocardia otitidis-caviarum</i>	7	0.18
<i>Nocardia harenae</i>	2	0.05
<i>Nocardia transvalensis</i>	1	0.02
<i>Nocardia</i> sp	531	13.99
Actinomicetos	388	10.23
Total	3,796	100.00

La tabla 2 muestra a los principales agentes de actinomicetoma. Imagen tomada de la Gaceta Médica de México. 2013; 149:586-92.

### **3. OBJETIVOS**

#### **Objetivo General.**

Determinar la inhibición de *Nocardia brasiliensis* a través de dos pruebas; método de dilución en placa y prueba de sensibilidad por macrodilución en caldo al enfrentarlo a diferentes diluciones de propóleo. Para aplicarlo como posible tratamiento de esta actinomicosis.

#### **Objetivos particulares.**

- Determinar la inhibición que causa el propóleo sobre cepas de *Nocardia brasiliensis* a través de una prueba cualitativa en placa.
- Determinar cuantitativamente la inhibición causada por el propóleo sobre *Nocardia brasiliensis* mediante la prueba de sensibilidad por macrodilución en caldo.

#### **4. HIPÓTESIS**

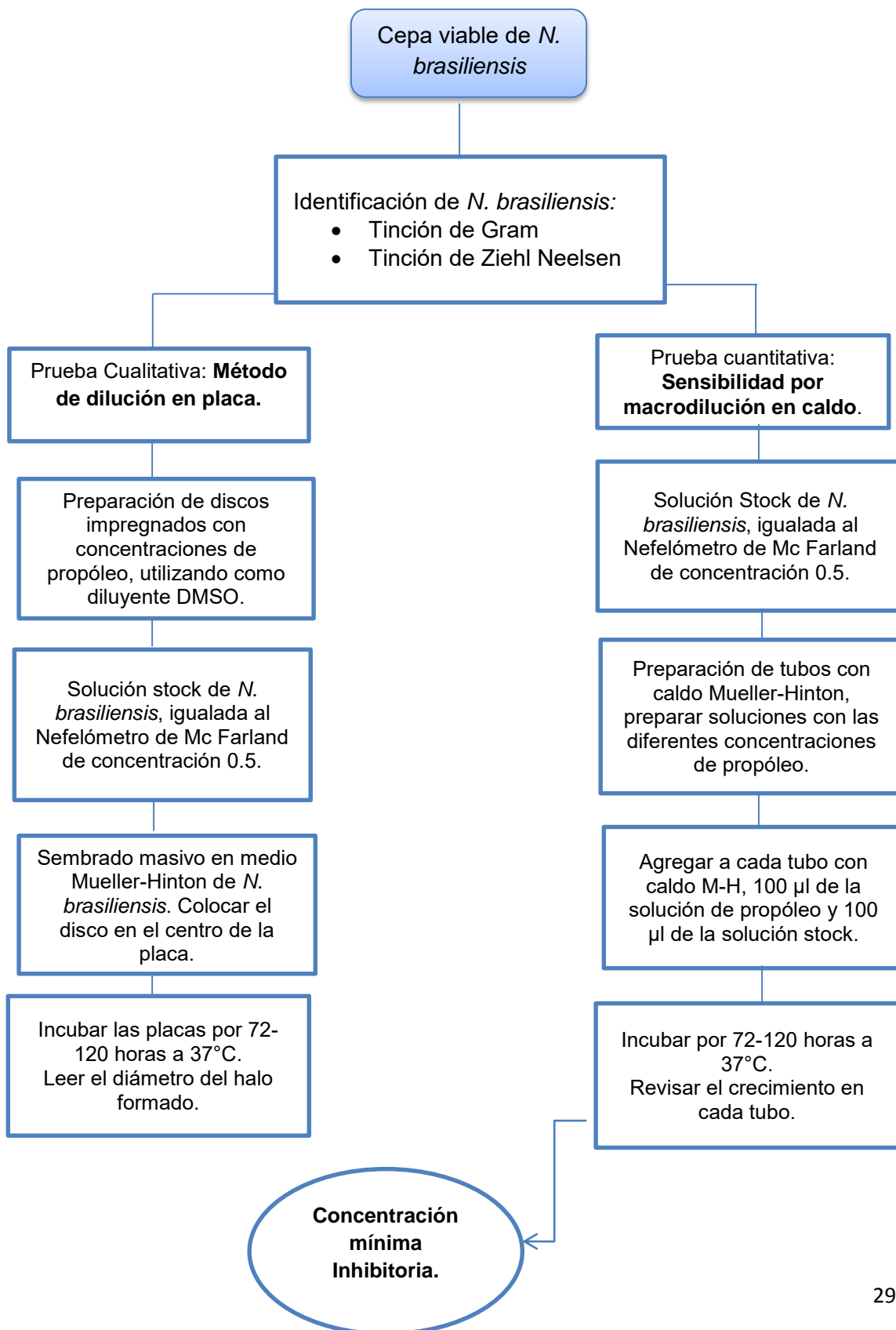
Sí el propóleo presenta propiedades antimicrobianas entonces se contrarrestará el crecimiento de *Nocardia brasiliensis*.

## 5. JUSTIFICACIÓN

El objetivo de este proyecto es contribuir en el posible tratamiento contra el micetoma causado por *Nocardia brasiliensis*. Se ha mencionado que en México se presentan numerosos casos, afectando principalmente a hombres que se dedican a la agricultura, una de las principales actividades que permiten el desarrollo económico en nuestro país.

Se prueba el propóleo por ser una sustancia antimicrobiana de origen natural y de bajo costo el cual no tiene efectos adversos como tratamientos que ya existen para combatir esta enfermedad que tienen un costo mayor y son de uso prolongado.

## 6. DISEÑO EXPERIMENTAL



## **7. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **7.1 Prueba cualitativa; Método de dilución en placa.**

Se realizó tinción de Ziehl Neelsen para la determinación de *Nocardia brasiliensis*, posteriormente se sembró en medio de Mueller Hinton, incubando a 37°C durante 72 horas.

Preparación de soluciones de propóleo utilizando como diluyente 100µL de DMSO (Dimetilsulfoxido) llegando a diferentes concentraciones de propóleo (0.5, 1.0, 3.0, 4.0 mg/mL), se impregnaron discos estériles de 0.5 cm de diámetro con 10µL de DMSO. Se sembró la cepa de *Nocardia brasiliensis* proveniente de una solución Stock que fue igualada al Nefelómetro de Mc Farland, en medios de Mueller-Hinton por técnica masivo, colocar el disco impregnado con propóleo en el centro, incubar a 37°C por 72-120 horas, revisar cada 24 horas. Identificar el halo de inhibición en las cajas con diferentes concentraciones y medirlo.

### **7.2 Prueba cuantitativa; Sensibilidad por macrodilución en caldo.**

#### **(Método modificado de NCCLS M27-A2)**

Se prepararon tubos con 2 mL de caldo Mueller-Hinton; una vez estériles, se le adicionó concentraciones de 6.0, 5.5, 5.0, 4.5, 4.0, 3.5, 3.0, 2.5, 2.0, 1.5, 1.0, 0.5 mg/mL de propóleo. A partir de un cultivo de *Nocardia brasiliensis* de 72h, se preparó un inóculo; igualado al tubo 0.5 del Nefelómetro de Mc Farland ( $1 \times 10^6$  UFC/mL) en solución salina fisiológica estéril, a los tubos se le agregó 100µL de inóculo, respectivamente. Fueron homogeneizadas e incubadas a 37°C durante 72-120 h. Transcurrido el tiempo de incubación se tomaron 10 µL de cada tubo y fueron sembrados en cajas de Agar Sangre, para determinar el crecimiento de la cepa comparando con lo observado en los tubos.

### 7.3 Material:

- Propóleo originario de la FES-C Campo 4.
- Cepa de *Nocardia brasiliensis*.

Medios de cultivo.

- Agar SDA más agua de coco
- SDA (MCD Lab)
- Agar Mueller-Hinton (Dibico)
- Agar sangre (MCD Lab)
- Caldo Mueller-Hinton (Dibico)

Tinciones.

- Tinción de Ziehl-Neelsen (Randox)
- Tinción de Gram (Reamex)

Otros:

- Microscopio óptico de campo claro marca Leica
- Mechero de Fisher
- Estufa bacteriológica (Riossa)
- Tubo con agua estéril
- Papel Whatman
- Membranas de 0.44 micras y 0.22 micras
- Tubos de Mc Farland ( $1 \times 10^6$  UFC/mL)
- Discos 0.5 mm de diámetro.
- Balanza analítica

## 8. RESULTADOS

### Identificación de *Nocardia brasiliensis*

Al cabo de 2 meses de recuperación de la cepa para mantenerla viable e iniciar con las pruebas, se muestra en la Imagen 6 el crecimiento característico de *Nocardia brasiliensis* en agar sangre; colonias granulares que muestran un color blanco amarillento, con olor característico a tierra mojada. Parte de las pruebas de identificación de dicha cepa fue la realización de la tinción de Ziehl-Neelsen (Imagen 7) y la tinción de Gram (Imagen 8).



Imagen 6. **Crecimiento característico de *Nocardia brasiliensis*** en medio agar sangre, colonias granulares que muestran un color blanco amarillento, con olor característico a tierra mojada. Imágenes tomadas en el Laboratorio 10 de Microbiología, Unidad de Posgrado de FESC Campo 1 UNAM.



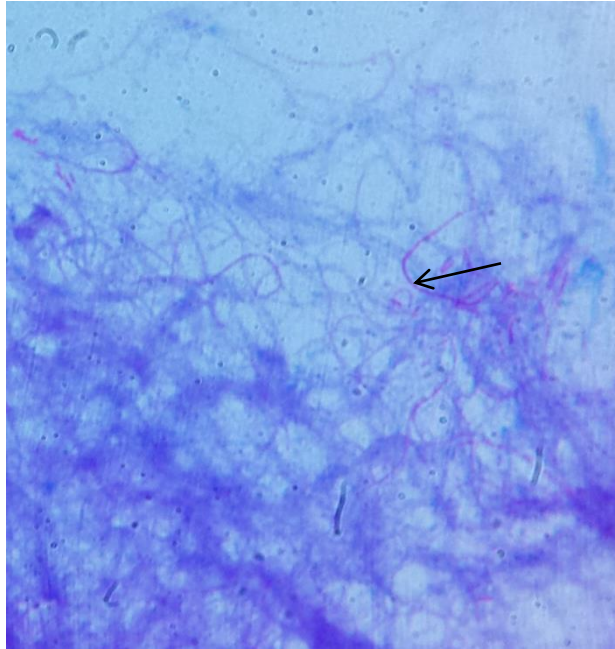


Imagen 7. **Tinción de Ziehl-Neelsen de la cepa de *Nocardia brasiliensis***, se observan filamentos parcialmente ácido alcohol-resistentes. Imagen observada al microscopio en objetivo 100x. Imagen tomada en el Laboratorio 10 de Microbiología, Unidad de Posgrado de FESC Campo 1 UNAM.



Imagen 8. **Tinción de gram de la cepa de *Nocardia brasiliensis***, se observa un actinomiceto Gram-positivo, que fragmenta en cocos o bacilos. Imagen observada al microscopio en objetivo 100x. Imagen tomada en el Laboratorio 10 de Microbiología, Unidad de Posgrado de FESC Campo 1 UNAM.

### **Prueba cualitativa; Método de dilución en placa.**

La imagen 9 muestra el control negativo, en la placa se observa el crecimiento masivo al colocar un disco impregnado con Dimetilsulfóxido (DMSO). Lo cual descarta al DMSO como posible inhibidor de *Nocardia brasiliensis*.



Imagen 9. **Muestra el control negativo**, existe un crecimiento masivo de *N. brasiliensis* en medio M-H al utilizar un disco impregnado con DMSO. Imagen tomada en el Laboratorio 10 de Microbiología, Unidad de Posgrado de FESC Campo 1 UNAM.

### **Placa con una concentración final de 0.5 mg/mL de una dilución de propóleo.**

La imagen 10 muestra el crecimiento masivo del actinomiceto en medio Mueller-Hinton, lo que nos indica que se necesita aumentar la concentración de propóleo para poder observar un halo de inhibición sobre la cepa.



Imagen 10. Se observa el crecimiento de *N. brasiliensis* en medio M-H, utilizando una concentración de propóleo al 0.5 mg/mL. Imagen tomada en el Laboratorio 10 de Microbiología, Unidad de Posgrado de FESC Campo 1 UNAM.

**Placa con una concentración final de 3.0 mg/mL de una dilución de propóleo.**

En la siguiente imagen se puede observar el pequeño halo de inhibición (8 mm) que se formó al utilizar una concentración de 3.0 mg/mL de una dilución de propóleo y el crecimiento masivo en el resto del agar, se puede observar el rompimiento del agar debido al tiempo prolongado de incubación que se requirió para que la cepa tuviera un crecimiento.

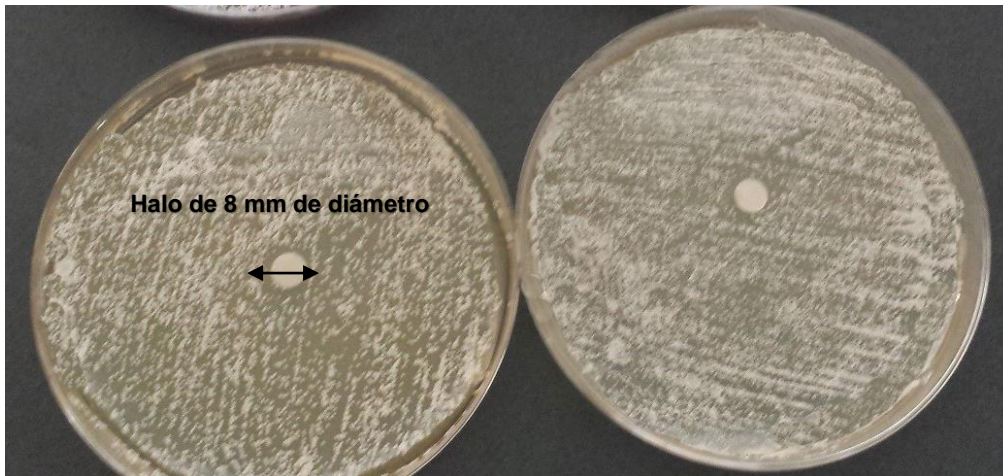


Imagen 11. Crecimiento de *N. brasiliensis* en medio M-H, se comienza a observar un halo de inhibición utilizando una concentración de 3.0 mg/mL de propóleo. Imagen tomada en el Laboratorio 10 de Microbiología, Unidad de Posgrado de FESC Campo 1 UNAM.

**Placa con una concentración final de 3.5 mg/mL de una dilución de propóleo.**

En la imagen 12 se puede observar el halo de inhibición de 15 mm de diámetro que se formó al utilizar una concentración de 3.5 mg/mL de una dilución de propóleo. El halo se observa radial y se puede apreciar el crecimiento masivo en el resto de la placa.



Imagen 12. Crecimiento de *N. brasiliensis* en medio M-H, donde se observó un halo notable (15 mm), causado por una concentración de 3.5 mg/mL de una dilución de propóleo. Imagen tomada en el Laboratorio 10 de Microbiología, Unidad de Posgrado de FESC Campo 1 UNAM.

**Placa con una concentración final de 4.0 mg/mL de propóleo.** En la imagen 13 se puede apreciar la inhibición del crecimiento que causa el propóleo sobre la cepa de *N. brasiliensis*, Se observa un halo de inhibición de 32 mm de diámetro, con crecimiento masivo en el resto de la placa. Se obtuvo la concentración mínima inhibitoria, es de 4 mg/mL.

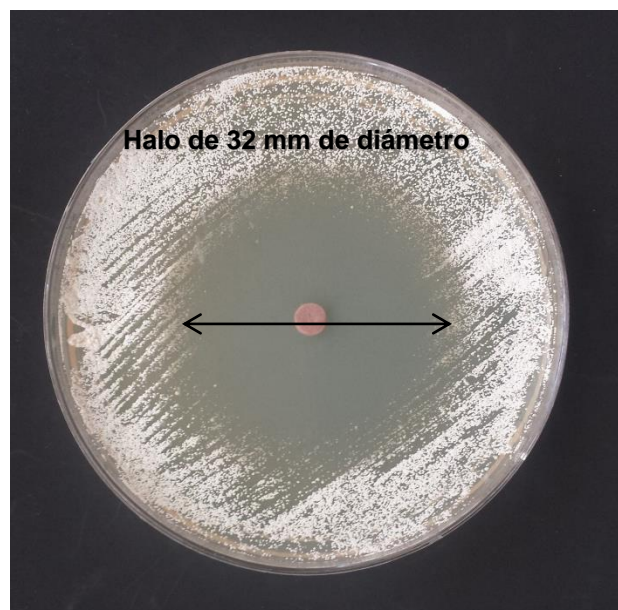


Imagen 13. Se observa el efecto inhibitorio del propóleo sobre *N. brasiliensis* en una concentración de 4.0 mg/mL. Existe un halo de 32 mm. Imagen tomada en el Laboratorio 10 de Microbiología, Unidad de Posgrado de FESC Campo 1 UNAM.

### **Prueba cuantitativa (Sensibilidad por macrodilución en caldo).**

La imagen 14 muestra el control negativo, es un tubo con caldo Mueller-Hinton adicionado con 100  $\mu$ L de DMSO y se observan el crecimiento de *Nocardia brasiliensis* en la superficie del caldo. Posteriormente en la imagen 15 y 16 se observan controles negativo y positivo respectivamente. En la imagen 16 se observa el halo de inhibición de 42 mm de diámetro causado por amikacina,



Imagen 14. Se observa el **control negativo** utilizando caldo M-H más DMSO, se puede apreciar el crecimiento de *N. brasiliensis*. Imagen tomada en el Laboratorio 10 de Microbiología, Unidad de Posgrado de FESC Campo 1 UNAM.



Imagen 15. Se observa el **control negativo** utilizando un disco impregnado con AMPICILINA, se puede apreciar el crecimiento de *N. brasiliensis*. Imagen tomada en el Laboratorio 10 de Microbiología, Unidad de Posgrado de FESC Campo 1 UNAM.

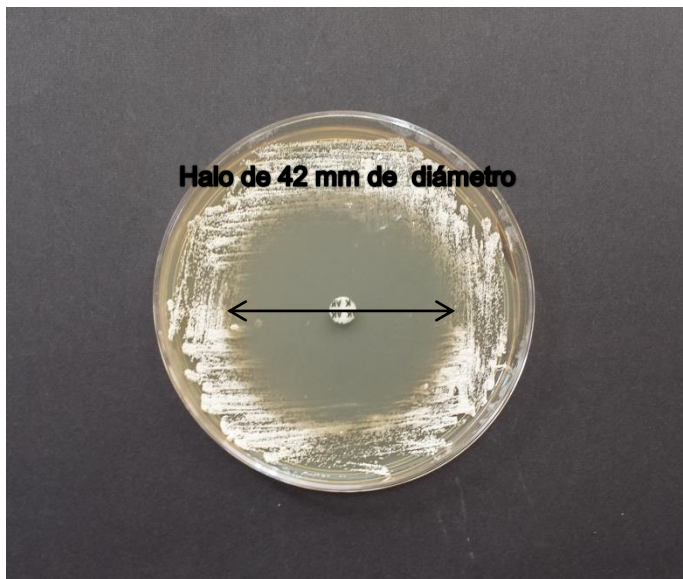


Imagen 16. Se observa el **control positivo** utilizando un disco impregnado con AMIKACINA, se aprecia el halo que este antibiótico causa sobre el crecimiento de *N. brasiliensis*, el halo mide 42 mm. Imagen tomada en el Laboratorio 10 de Microbiología, Unidad de Posgrado de FESC Campo 1 UNAM.

Las imágenes siguientes muestran una serie de diluciones de propóleo donde se inocularon 100  $\mu$ L de una solución Stock del actinomiceto, en los tubos con caldo Mueller-Hinton se observa el crecimiento de *N. brasiliensis* en la superficie, se observan los granos de color blanco-amarillento. Se puede apreciar en la imagen 17 que en las concentraciones 0.5mg/mL a 3.5 mg/mL el crecimiento, aunque en las concentraciones más altas disminuye éste (Imagen 18,19 y 20). El color que se observa en el caldo depende de la concentración del propóleo que se le adicionó. En las imágenes 18 y 19 se señala la concentración mínima inhibitoria, 4 mg/mL.

En la imagen 20 se observan tubos adicionados con diluciones de propóleo posteriores a la concentración mínima inhibitoria (4.5 mg/mL a 6.5 mg/mL), en estos tubos ya no se observa crecimiento del actinomiceto lo cual ayudo a determinar la CMI.

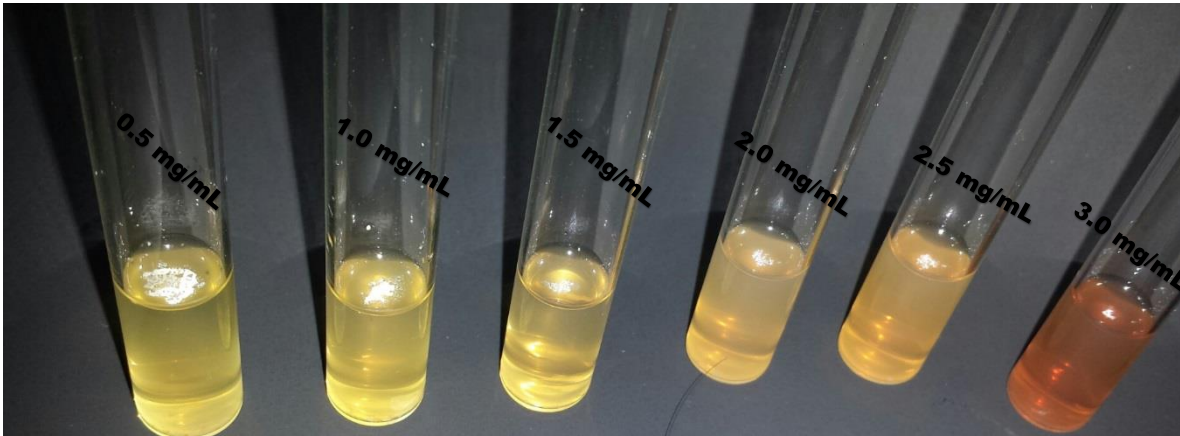


Imagen 17. Se observan concentraciones de propóleo donde no se inhibe el crecimiento de *N. brasiliensis*. Las concentraciones van de 0.5 mg/mL a 3.0 mg/mL. Imagen tomada en el Laboratorio 10 de Microbiología, Unidad de Posgrado de FESC Campo 1 UNAM.



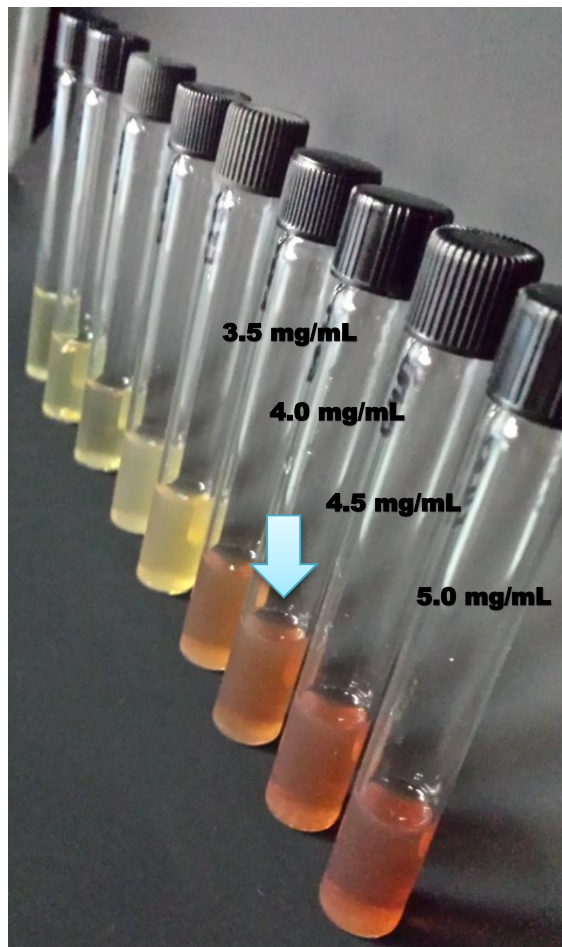


Imagen 18. Se observan concentraciones de propóleo donde se inhibió el crecimiento de *N. brasiliensis*. Las concentraciones van de 3.5 mg/mL a 5.0 mg/mL, se hace hincapié en la concentración 4.0 (señalada con una flecha) ya que es la CMI y no se observa crecimiento del actinomiceto. Imagen tomada en el Laboratorio 10 de Microbiología, Unidad de Posgrado de FESC Campo 1 UNAM.

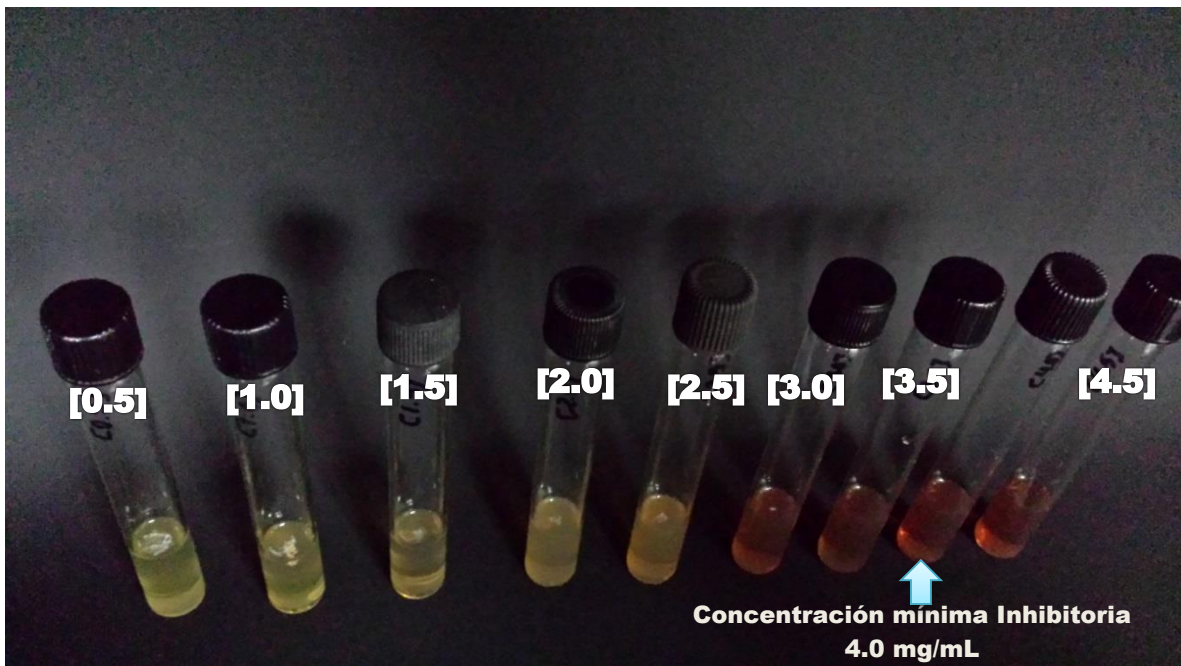


Imagen 19. Se muestra la concentración mínima inhibitoria de propóleo contra *N. brasiliensis*. En el tubo con concentración 4.0 mg/mL no se observa crecimiento en la superficie como se aprecia en las concentraciones anteriores a ésta. Imagen tomada en el Laboratorio 10 de Microbiología, Unidad de Posgrado de FESC Campo 1 UNAM.

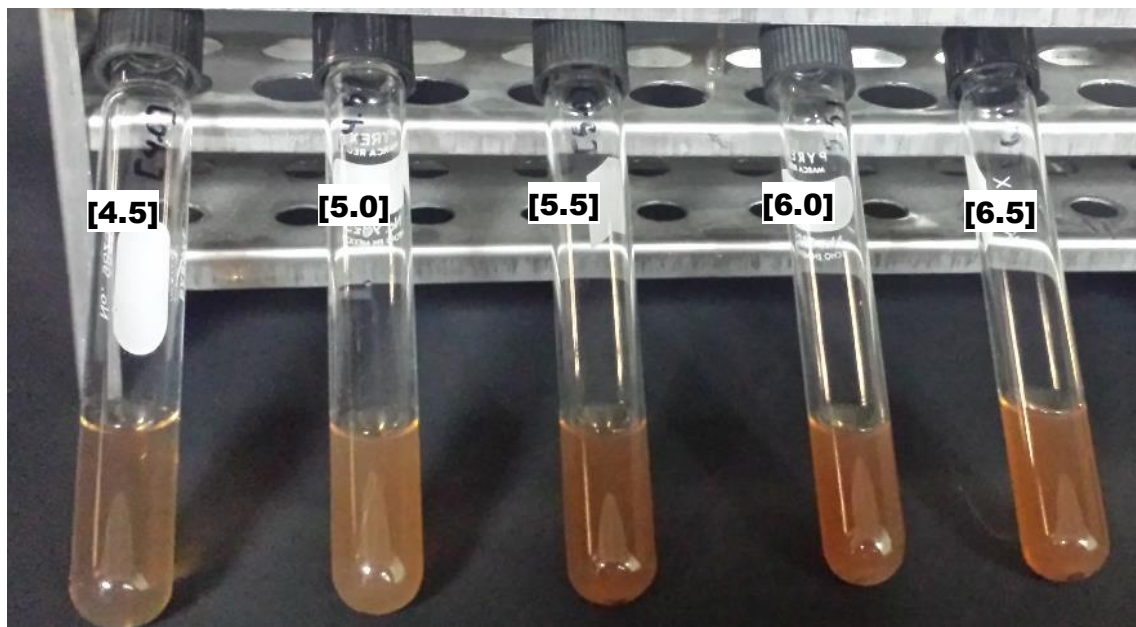


Imagen 20. Se observan cinco concentraciones posterior a la CMB, donde no se observa crecimiento de *N. brasiliensis*. Imagen tomada en el Laboratorio 10 de Microbiología, Unidad de Posgrado de FESC Campo 1 UNAM.

## 9. DISCUSIÓN

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto causado por el propóleo sobre la cepa de *Nocardia brasiliensis*, actinomiceto que causa la enfermedad del “Micetoma”.

Como primer paso se procedió a la identificación y conservación de *N. brasiliensis*, cepa resguardada en el Laboratorio 10 de Microbiología, Unidad de Posgrado en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán C-1. Al mantener la cepa viable se comenzó a probar el medio que cumplía mejor las exigencias nutricionales de la bacteria y favorecía su crecimiento.

Se probó Agar Sangre, Agar Dextrosa Saboraud adicionando agua de coco, Agar Mueller-Hinton adicionado con sangre de ternero y Agar Mueller-Hinton, encontrando mejor crecimiento en éste último. Este medio se utiliza en el procedimiento de difusión en disco estandarizado para la determinación de la sensibilidad de cepas aisladas a partir de muestras clínicas, de organismos aerobios de rápido crecimiento ante agentes antimicrobianos, conforme a las normas del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (Arenas R., 2002).

De acuerdo a los resultados obtenidos al realizar las pruebas: Método de dilución en placa, Sensibilidad por macrodilución en caldo, cualitativa y cuantitativa respectivamente, se encontró que existe una inhibición del crecimiento de este actinomiceto al utilizar una concentración de 4.0 mg/mL de propóleo. (Imágenes 18 y 19).

Durante la primer prueba, método de dilución en placa, se probaron concentraciones bajas de propóleo: 0.5 mg/mL, 1.0 mg/mL y concentraciones más altas: 3.0 mg/mL, 4.0 mg/mL a pesar de no ser una prueba cuantitativa, los resultados obtenidos en ella, nos proporcionaron un parámetro cualitativo para conocer que el propóleo probado si muestra una inhibición sobre *Nocardia*

*brasiliensis*, proporcionándonos un parámetro de referencia para la siguiente prueba.

Finalmente se trabajó con las siguientes concentraciones; 0.5 mg/mL, 3.0 mg/mL, 3.5 mg/mL y 4.0 mg/mL, siendo esta última la concentración mínima inhibitoria, observándose un halo de 32 milímetros de diámetro. (Imagen 13).

De acuerdo al diámetro del halo de inhibición de la prueba cualitativa se interpreta que el crecimiento de *Nocardia brasiliensis* se inhibe ante las diluciones trabajadas del propóleo. Para determinar lo dicho, se utilizaron controles positivos y negativos, como controles negativos, en primera instancia DMSO para descartar posible interferencia en el efecto inhibitorio por sus propiedades antimicrobianas. Otros controles utilizados fueron ciertos antibióticos, control negativo; Ampicilina, control positivo; Amikacina. Se probó dicho antibiótico porque el uso de ellos es el actual tratamiento para el micetoma por *N. brasiliensis*. Obteniendo estos resultados podemos hacer una comparación de acuerdo a la tabla del anexo 2, donde se muestran una serie de antibióticos probados para inhibir el crecimiento de una cepa de *Nocardia brasiliensis*. Mostrando un rango de sensibilidad entre 21 y 55 mm de diámetro del halo de inhibición, el resultado del halo obtenido en la prueba de dilución en placa en este trabajo fue de 32 mm de diámetro, concluyendo de esta manera que existe una sensibilidad de *N. brasiliensis* ante diluciones del propóleo.

La inhibición de *Nocardia brasiliensis* por medio del propóleo se analiza de acuerdo a los componentes químicos del microorganismo y a los componentes del propóleo, donde los flavonoides y los compuestos fenólicos se consideran como los principales componentes bioactivos de los propóleos. Los flavonoides: pinocembrina, galangina y pinobanksina se les atribuye la mayor actividad bacteriostática y bactericida (Gutiérrez, 2011).

El ácido cinámico y algunos flavonoides son los responsables de desacoplar la transducción de energía de la membrana plasmática inhibiendo la motilidad bacteriana. Así mismo se ha determinado que el propóleo desorganiza la

membrana citoplasmática, la pared celular y el citoplasma provocando una bacteriólisis parcial acompañado de inhibición en la síntesis de proteínas.

En lo que se refiere a la galangina se sabe que provoca un incremento considerable en la pérdida de potasio lo cual se atribuye al daño ocasionado 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. Se ha determinado que la quercetina inhibe la ADN girasa de manera parcial (Estrada, 2012).

Tabla 5. Constituyentes del EEP de Cuautitlán Izcalli, Estado de México.

Pico	TR (minutos)	% Total	Compuesto propuesto por la base de datos
1	10.259	0.45	Palmitato de etilo
2	11.025	0.47	Éster etílico del ácido oleico
3	12.467	58.48	Pinocembrina
4	13.162	9.55	Tectocrisina
5	13.298	2.60	1-(3-aminopropil)azaciclotridecan-2-ona

Tomada de: Tesis de Maestría, Perfil químico de Propóleos mexicanos para su aplicación en medicina veterinaria, p. 53, por Rodríguez B. 2015.

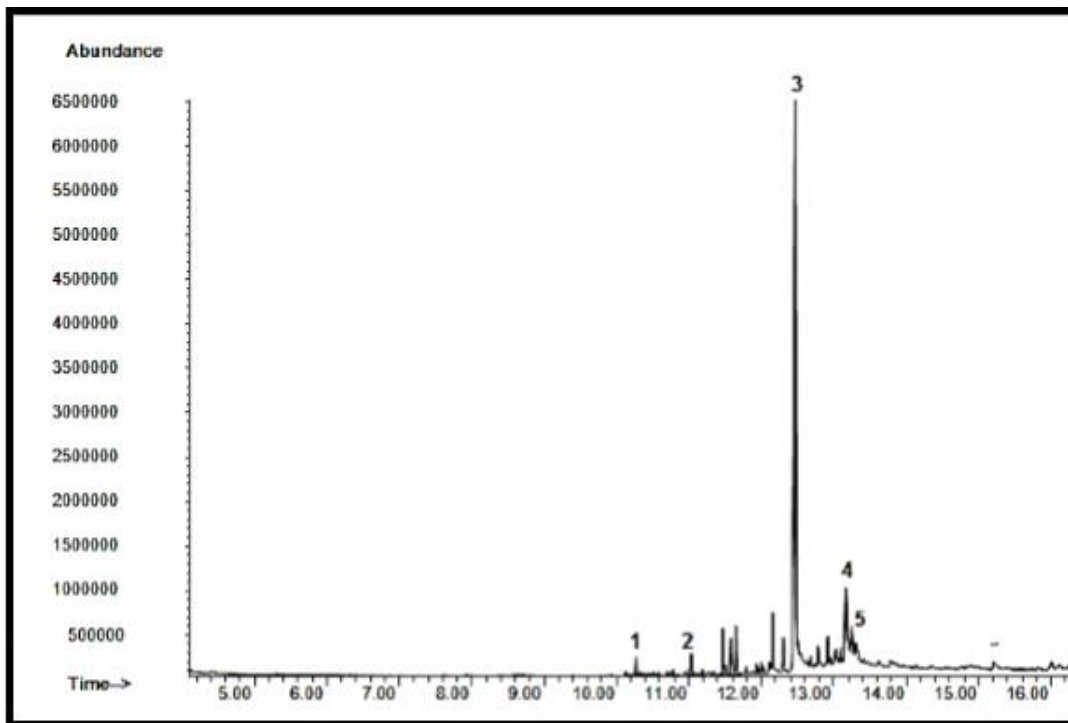


Figura 3. Cromatograma que muestra los componentes del EEP de Cuautitlán Izcalli, Estado de México. Se observa el pico más alto en el flavonoide; pinocembrina. Tomada de: Tesis de Maestría, Perfil químico de Propóleos mexicanos para su aplicación en medicina veterinaria, p. 53, por Rodríguez B. 2015

## 10. CONCLUSIONES

- Se analizó la actividad del propóleo sobre la cepa de *Nocardia brasiliensis*, comprobando que existe sensibilidad al propóleo.
- Al realizar la prueba cualitativa, método de dilución en placa se encontró un halo de inhibición de 32 milímetros con la concentración de 4.0 mg/mL de diluciones de propóleo.
- Finalmente en la prueba cuantitativa, macrodilución en caldo se determinó la concentración mínima inhibitoria de propóleo sobre *Nocardia brasiliensis* es de 4 mg/mL.

## 11.RECOMENDACIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en este proyecto se observa que el propóleo inhibe a la cepa de *Nocardia brasiliensis*, microorganismo causante de la enfermedad del micetoma.

Se sugiere continuar con estos estudios ya que esto abre el panorama para poder considerar la administración de concentraciones de propóleo como posible tratamiento alternativo contra el micetoma. Comparando con otros medicamentos y tomando en cuenta su efecto, costo y evitando la mayor presencia de reacciones adversas a lo largo de su administración.

Además de probar otros propóleos de diversos orígenes ya que de acuerdo al lugar de donde se obtiene el mismo depende la efectividad antimicótica obtenida.



## 12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Arenas R. (2002). *Dermatología. Atlas, diagnóstico y tratamiento*. 5a Ed. McGraw- Hill, Interamericana, México. Pág.: 355-361.
2. Azuma, I., et al. (1975). *Partial chemical characterization of the cell wall of Nocardia asteroides strain 131*. Jpn J Microbiol, 17(2): Pág. 154-159.
3. Beaman, B.L., A.L. Bourgeois, and S.E. Moring. (1981). *Cell wall modification resulting from in vitro induction of L-phase variants of Nocardia asteroides*. J Bacteriol, 148(2): Pág.: 600-609.
4. Beaman, B.L. (1975). *Structural and biochemical alterations of Nocardia asteroides cell walls during its growth cycle*. J Bacteriol, 123(3): Pág.: 1235-1253.
5. Banskota A. Tezuka Y., Kadota S. (2011). *Recent Progress in Pharmacological Research of Propolis*. Japan. Phytother Res. Pág.: 561-571.
6. Bennet JE; Jennings AE. (1988). *Factors influencing susceptibility of Nocardia species to trimethoprim- sulfamethoxazole*. Antimicrob. Ag and Chemother. 13 4: Pág.: 624.
7. Bout G. 2000). *Aspectos epidemiológicos del micetoma. Análisis de 502 casos estudiados en el Centro Dermatológico Pascua*. Tesis de Posgrado, México.

8. Bojalil LF Cerbón J. (1999). *Schema for the differentiation of Nocardia asteroides and Nocardia brasiliensis* J Bacteriol. 78 (6). Pág.: 33-40.
9. Bonifaz, A. (2012). *Micología Médica Básica*, Méndez Editores, México, D.F., Pág.: 222-240.
10. Conde C Melendro El Fresan M Ortíz-Ortíz, L. (1982). *Nocardia brasiliensis* mycetoma induction and growth cycle. Inf and Imm. 38: Pág.: 1291.
11. Conville, P., Fischer, S., Cartwright, C., Witebsky, F. (2000). *Identification of Nocardia species by restriction endonuclease analysis of an amplified portion of the 16S rRNA gene*. J. Clin. Microbiol. 38: Pág.: 158-164.
12. Conville, P.S.; Witebsky, F.G. (2007). *Nocardia, Rhodococcus, Gordonia, Actinomadura, Streptomyces and other Aerobic Actinomycetes*. En: Murray, P.R.; Baron, E.J.; Jorgensen, J.H, Landry, M.L.; Tenover, M.C.; Tenover, M.A.: Manual of Clinical Microbiology, 9ª. ASM Press, Washington DC. Pág.: 515.
13. Curry, W. (2000). *Human nocardiosis, a clinical review with selected case reports*. Arch Intern Med. 140: Pág.: 819-826.
14. Dávila RM, Arenas R. (2001). *Micetoma diseminado por Nocardia brasiliensis con afección ósea y pulmonar*. Dermatología Revista Mexicana; 39(5): Pág.: 287-289.

15. Daoud, M., Ezzine, S., Badri, T., Mokhtar, I., Fazaa, B., Kamoun, M. (2005). *Mycetoma: retrospective study of 13 cases in Tunisia*. Acta Dermatoven. 14: Pág.: 153-156.
16. Estrada García, Perla Alejandra. (2012). *Evaluación in vitro del efecto del propóleo sobre microsporium canis*. Tesis de grado, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.
17. González, G.A. & Bernal M.R. (2002). *Propóleos: un camino hacia la salud*. Jalisco, México: Ediciones cuarto día. Pág. 7-40.
18. González-Ochoa, A. (1985). *Mycetoma by Nocardia brasiliensis*. Rev. Inst. Salubr. Enferm. trop. 22: Pág.: 15-24.
19. Gutiérrez E. (2011). *Actividad antibacterial y perfil químico de propóleos mexicanos sobre cepas de Pasteurella multocida aislada en conejos*. Tesis de Maestría, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.
20. Kamisil Isik, Fadime O. (2006). *Antimicrobial activity screening of some sulfonamide derivatives on some Nocardia species and isolates*, Pág. 55.
21. Kwapinski, JB., Seelinger, HPR. (1965). *Investigations on the antigenic structure of actinomycelates: IX serological classification of the Nocardiae with the polysaccharide fractions of their cell walls*. Mycopathol. 25: Pág.: 173-782.

22. Lavallo P. (2008). *Nuevos datos sobre la etiología del micetoma en México y sobre su patogenia*. Gaceta Médica de México; 96(6): Pág.: 554-569.
23. López, M., Méndez, L., Bonifaz A., et al. (2013). *Actualización de la epidemiología del micetoma en México. Revisión de 3,933 casos*. Revisión Gaceta Médica de México, 149: 586-92
24. López Zamora Cristian Ismael, (2012). *Evaluación in vitro del propóleo sobre microsporium gypseum*. Tesis de grado, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.
25. McClung NM (1949). *Morphological studies in the genus Nocardia III. Developmental studies*. Lloydia (12) 3: Pág.: 137-177.
26. McNeil, M., Brown, J. (1994). *The medically important aerobic actinomycetes: epidemiology and mycobiology*. Clin Microbiol Reviews. Pág.: 357-417.
27. Marcucci MC. (1995). *Propolis: chemical composition, biological, properties and therapeutic activity*. Brazil. Rev. Apidología Elsevier. Pág.: 83-99.
28. Muñoz F, García M, Mayorca J. Micetomas. (2000). *Estudio epidemiológico de 13 años en el Occidente de México (1981-1993)*. Dermatología Revista Mexicana; 39(1): Pág.:13-17.

29. Novales J. (1995). *Contribución de la dermatopatología al conocimiento de los micetomas. Medicina cutánea ILA*; 23: Pág.: 248-252.
30. Ortiz-Ortiz L, López JS, Parks DE, Weigle WD (1979). *Lymphocyte-B with an extract of Nocardia brasiliensis. Inf. and Imm. 25*:Pág.: 627.
31. Palomino G. L. R., Martínez, G.J.P., García, P.C.M., y Durango, R.D.L. (2010). *Caracterización Físicoquímica y Actividad Antimicrobiana del Propóleo en el Municipio de La Unión (Antioquia, Colombia)*. Revista Facultad Nacional de Agronomía-Medellín. Pág.: 373-5383.
32. Peña, R. (2008). *Estandarización en propóleos: antecedentes químicos y biológicos. Cien. Inv. Agr.*; 35 (1): Pág.: 17-26.
33. Quintero M, Londoño A., Soto C, García C, Carrillo L. (2011). *Structural and genetic alterations of fungal cells caused by mexican popolis. Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*. A. Méndez-Vilas (Ed.) Pág.: 1068-1073.
34. Saiz M., Lobo C., Serrano J. (2002). *Conferencia: Actividad antitumoral del propóleo. Natura medicafrax*.
35. Saúl A. (1998). *Lesiones de Dermatología*. 13ª ed. Méndez editores. México.

36. Soto L. (1998). *Micetoma: Estudio inmunológico. Evaluación inmunológica de 12 casos de micetoma por Nocardia brasiliensis en el Centro Dermatológico Pascua*. Tesis de Posgrado, México.
37. Welsh O. (1991). *Mycetoma. Current concepts in treatment. International Journal of Dermatology*, 30(6): Pág.: 387-398.
38. Williams, T., Sharpe, M.E., Holt, J.G. Bergey's. (1989). *Manual of systematic bacteriology*. Vol. 4. EUA. Williams & Wilkins Co. Pág.: 2333-2362.

## **13. ANEXO**

### **13.1 Dimetilsulfóxido.**

Es un solvente aprótico y altamente polar. Por ello, es miscible tanto con el agua como con solventes orgánicos como alcoholes, cetonas etc. Puede formar complejos en sistemas biológicos.

Pertenece a la clase 3 de los solventes orgánicos. Los solventes clase 3 son solventes con bajo potencial tóxico para el hombre, por lo que no es necesario límites de exposición, son considerados menos tóxicos y de menor riesgo para la salud humana. A los solventes incluidos en la clase 3 no se les asocia con daños a la salud humana a los niveles normalmente aceptados.

Sin embargo, no existen estudios de toxicidad en períodos largos de tiempo o carcinogenicidad para muchos de los solventes de esta clase (CPMP/QWP/450/03 & EMEA/CVMP/511/03, 2005). Datos disponibles indican que los solventes incluidos en la categoría clase 3, según la ICH, mostraron toxicidad menor que 16 solventes categoría 1 y 2 en estudios de corto plazo y resultados negativos en estudios de genotoxicidad.

Se considera que la presencia de cantidades de 50 mg por día o menos (correspondiente a 5000 ppm o 0.5%) de estos solventes en medicamentos podrían ser aceptables junto a una justificación.

**CUADRO 1.2.1** Solventes clase 3 los cuales podrían ser limitados por GMP u otros requerimientos basados en calidad.

Ácido acético	Etanol	3-Metil-1-butanol
Acetona	Etil acetate	Metiletil cetona
Anisol	Etil éter	Metilisobutil cetona
1-Butanol	Etil formato	2-Metil-1-propanol
2-Butanol	Ácido fórmico	Pentano
Butil acetate	Heptano	1-Pentanol
tert-Butilmetil éter	Isobutil acetato	1-Propanol
Cumeno	Isopropil acetato	2-Propanol
Dimetil sulfóxido	Metil acetato	Propil acetato



### 13.2 Susceptibilidad de *Nocardia brasiliensis* ante algunos antibióticos.

**Table 3.** Susceptibility percentage and median zone diameter (mm) of *Nocardia* sp. against sulfonamide derivatives and some antimicrobials determined by disk diffusion method

Antimicrobials		Inhibition of zone diameter (mm) <sup>a</sup>			Zone diameter (mm)		Tested nocardial samples susceptibility range (%) (n = 35) <sup>b</sup>		
Name	Concentration (µg)	R	I	S	Range	Median	R	I	S <sup>c</sup>
Amikacin AK	30	≤ 14	15–16	≥ 17	21–55	38	0	0	35 (100)
Ampicillin AMP	10	≤ 13	14–16	≥ 17	0–43	21.5	27 (77.2)	1 (2.8)	7 (20)
Carbenicillin CAR	10	≤ 19	20–22	≥ 23	0–42	21	28 (80)	2 (5.8)	5 (14.2)
Cefotaxime CTX	30	≤ 14	15–22	≥ 23	0–42	21	20 (57.2)	3 (8.6)	12 (34.2)
Trimoprim STX	25	≤ 10	11–15	≥ 16	0–45	22.5	3 (8.6)	2 (5.7)	30 (85.7)
Sulfisoxazole ST	300 <sup>d</sup>	≤ 12	13–16	≥ 17	0–56	28	1 (2.8)	0	34 (97.2)
Compound-I	300	≤ 12	13–16	≥ 17	10–27	18.5	5 (14.3)	11 (31.5)	19 (54.2)
Compound-II	300	≤ 12	13–16	≥ 17	0–22	11	33 (94.4)	1 (2.8)	1 (2.8)
Compound-III	300	≤ 12	13–16	≥ 17	0–39	19.5	4 (11.4)	5 (14.3)	26 (74.3)
Compound-IV	300	≤ 12	13–16	≥ 17	16–50	33	0	1 (2.8)	34 (97.2)
Compound-V	300	≤ 12	13–16	≥ 17	10–40	25	0	4 (11.4)	31 (88.6)
Compound-VI	300	≤ 12	13–16	≥ 17	0–27	13.5	3 (8.6)	12 (34.2)	20 (57.2)
Compound-VII	300	≤ 12	13–16	≥ 17	0–25	12.5	13 (37.1)	15 (42.9)	7 (20)

<sup>a</sup>Zone of inhibition diameter (mm) by disk diffusion method susceptibility testing interpretive guidelines based on NCCLS 2003.  
<sup>b</sup>Number in parentheses indicate the total number of nocardial samples tested.  
<sup>c</sup>S = susceptible; I = intermediate; R = resistant.  
<sup>d</sup>Sulfisoxazole ST-300 is being taken as a positive control for evaluating compounds data.

Tabla 3. Se observa la actividad inhibitoria que mostró una cepa de *N. brasiliensis* ante algunos antibióticos. Siendo de interés para éste trabajo la actividad de Ampicilina y Amikacina. Tomada de: Antimicrobial activity screening of some sulfonamide derivatives on some *Nocardia* species and isolates, p. 55, por Kamil Isik, Fadime O. 2006.