

UNIVERSIDAD DE SONORA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD

Efecto de Propóleos de Ures, Sonora Recolectados en las Distintas
Épocas del Año Sobre el Desarrollo *in vitro* e *in vivo* de
Diferentes Especies de *Vibrio*



Que para obtener el grado de
Maestro en Ciencias de la Salud

Presenta

Patricia Ruiz Bustos

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



“El saber de mis hijos
hará mi grandeza”



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

FORMA DE APROBACIÓN

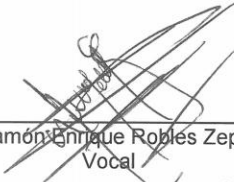
Los miembros del Jurado Calificador designado para revisar el trabajo de Tesis de Patricia Ruiz Bustos, lo han encontrado satisfactorio y recomiendan que sea aceptado como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias de la Salud.



Dr. Carlos Arturo Velázquez Contreras
Director Académico



M.C. Moisés Navarro Navarro
Secretario



Dr. Ramón Enrique Robles Zepeda
Vocal



Dr. Eduardo Ruiz Bustos
Suplente

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS

Al Señor por regalarme mis tres grandes tesoros.

A mis madres Margarita, Tiani, Tita y Tianina y mi padre José Eduardo, por ser el significado de amor incondicional hecho persona.

A mis hermanos Eduardo, Raquel, Rebeca y Juan, que siempre han estado a mi lado para ofrecerme una mano amorosa.

A mi esposo Aldo y nuestras amadísimas chaparritas Rebeca Isabel y Daniela Raquel, por motivarme a querer ser una mejor persona cada día.

A la Universidad de Sonora, por abrirme sus puertas y ofrecerme una valiosísima educación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo concedido para culminar esta etapa de formación.

A mi Director de Tesis, el Dr. Carlos Arturo Velázquez Contreras, que no solamente fue el arquitecto en esta etapa de mi formación, sino que también fue un gran amigo, apoyo y guía.

A mi comité evaluador, M.C. Moisés Navarro Navarro, Dr. Ramón Enrique Robles Zepeda y Dr. Eduardo Ruiz Bustos por su incansable apoyo y tiempo dedicado a la realización de este trabajo.

Al Laboratorio Estatal de Salud Pública por su donación de las distintas cepas bacterianas utilizadas en el experimental.

A la M.C. María Lucila Rascón Durán y la M.C. Martha Judith Valdéz Ortega que con mucho cariño y comprensión, me ayudaron a culminar esta etapa formativa.

Al Dr. Humberto Astiazarán García, gracias por compartir sus conocimientos con nosotros de una forma divertida.

A mis hermanos de la carrera Anita, Gaby, Lesley, Fabi, Heidy, Dianita, Lupi, Cayita, Ivette, Omar y Alí, gracias por ser mis cómplices en las buenas y en las malas, y por ayudarme a sentirme yo misma otra vez.

A mis compañeros de la generación de maestría Édgar, Niyirma, Zuilma y Karina, por compartir lindos momentos.

A la compañía del laboratorio, Dorita, Efraín, Jael, Paola, Ivonne, Davisela, Jorge, Sergio, Samuel, Caro Figueroa, Caro Jasso, por ser grandes apoyos en momentos difíciles.

CONTENIDO

	Página
LISTA DE TABLAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
OBJETIVOS	viii
RESUMEN	ix
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	3
Generalidades de Diferentes Especies de <i>Vibrio</i>	3
Generalidades de <i>Vibrio cholerae</i>	5
El Cólera y los Antibióticos	5
Propóleos	8
Temporalización de Propóleos	11
Modelo Murino de Infección	12
MATERIALES Y MÉTODOS	14
Muestras de Propóleos	14
Obtención de Extractos Metanólicos de Propóleos	14
Efecto de Propóleos Sobre el Crecimiento Bacteriano	14
Solución Concentrada de EMP	14
Solución de Trabajo de EMP	14
Inóculo Bacteriano	16
Determinación <i>in vitro</i> del Efecto Anti-vibrio	16
Cepas Bacterianas	17
Determinación <i>in vivo</i> del Efecto Anti-vibrio	17
Análisis Estadístico	19
RESULTADOS	20

Actividad Antibacteriana <i>in vitro</i> de Propóleos Obtenidos en las Diferentes Temporadas del Año Sobre <i>E. coli</i> ATCC 25922 y <i>S.</i> <i>aureus</i> 6538P	20
Actividad Inhibitoria del Crecimiento de Propóleos de Ures, Sonora Sobre Diferentes Especies de <i>Vibrio</i>	23
Actividad Antibacteriana <i>in vivo</i> de Propóleos	23
DISCUSIÓN	32
CONCLUSIONES	36
BIBLIOGRAFÍA	37
APÉNDICES	44

LISTA DE TABLAS

		Página
I	Las 10 principales causas de muerte en el mundo en el 2008	7
II	Coordenadas y plantas predominantes del lugar de recolección de propóleos	15
III	Cepas de bacterias utilizadas	18
IV	Características físicas y organolépticas de propóleos recolectados	21

LISTA DE FIGURAS

		Página
1	Efecto de propóleos recolectados en las diferentes épocas del año de la región de Ures, Sonora sobre <i>S. aureus</i> 6538P y <i>E. coli</i> 25922	22
2	Efecto de propóleos recolectados en las diferentes épocas del año de la región de Ures, Sonora sobre <i>Vibrio</i> sp.	24
3	Relación de la cepa bacteriana con respecto a la recuperación de UFC de los intestinos del ratón lactante	27
4	Efecto del tamaño del inóculo de <i>V. cholerae</i> O1 Inaba en el grado de infección	28
5	Efecto de la cantidad de propóleos en la sobrevivencia del ratón	29
6	Efecto de propóleos de Ures, Sonora sobre el crecimiento de <i>Vibrio cholerae</i> O1 Inaba	31

OBJETIVOS

General

Determinar el efecto que tienen los propóleos de Ures, Sonora, recolectados en las distintas épocas del año sobre el desarrollo *in vitro* e *in vivo* de diferentes especies de *Vibrio*.

Particulares

1. Determinar el efecto inhibitorio *in vitro* de propóleos obtenidos en las distintas estaciones del año de la localidad de Ures sobre diferentes especies del género *Vibrio*.
2. Establecer un modelo de infección bacteriana para *Vibrio cholerae* en ratones de la cepa CD-1.
3. Determinar el efecto inhibitorio *in vivo* de los propóleos de Ures sobre *Vibrio cholerae*, utilizando el modelo murino previamente establecido.

RESUMEN

Los propóleos son un producto elaborado por las abejas al mezclar las resinas de la vegetación circundante a la colmena con cera. Debido a la diversidad botánica disponible en el área de recolección de las abejas, los propóleos presentan una versatilidad química y biológica, siendo de especial interés para éste trabajo, la actividad antibacteriana de los propóleos Sonorenses. Previamente se evaluó la actividad antibacteriana de muestras de propóleos de las regiones de Caborca (PC), Ures (PU) y Pueblo de Álamos (PPA), Sonora, mediante la prueba de microdilución en caldo, concluyendo que los propóleos con mayor actividad antibacteriana (contra *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) fueron de la zona de Ures. *Vibrio cholerae* es un patógeno gastrointestinal humano de importancia clínica, asociado a severos padecimientos gastrointestinales causantes de fuertes diarreas y deshidratación a nivel mundial. Para profundizar en el conocimiento de la actividad que puedan tener los propóleos de esta región tanto *in vitro* como *in vivo*, en el presente trabajo se tomaron muestras de este producto natural durante las cuatro estaciones del período 2008-2009. A dichas muestras se les evaluó su actividad antibacteriana *in vitro* (método de microdilución en caldo) frente a distintas especies del género *Vibrio*: *V. cholerae* no O1, *V. cholerae* O1 Ogawa, *V. cholerae* O1 Inaba, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. fluvialis* y *V. mimicus*. Tres cepas mostraron ser sensibles a las cuatro muestras recolectadas (*V. mimicus*>*V. cholerae* no O1>*V. cholerae* O1 Inaba), con una concentración mínima inhibitoria (MIC₉₀) de entre 100-200 µg/mL; mientras que el resto de las cepas ensayadas la concentración mínima inhibitoria (MIC₉₀) fue entre 200 y >400 µg/mL (*V. cholerae* O1 Ogawa>*V. parahaemolyticus*>*V. alginolyticus*>*V. fluvialis*). En cuanto a la diferencia en la época de recolección, los datos estadísticos indican una respuesta diferencial hacia las diferentes

muestras de propóleos analizadas. Para las determinaciones antimicrobianas *in vivo*, se estableció un modelo murino de infección para *Vibrio cholerae* O1 Inaba utilizando ratones lactantes de la cepa CD-1. Resultados preliminares sugieren que propóleos de Ures, Sonora (verano), tienen un impacto importante en la infección por *V. cholerae* O1 Inaba. Estudios adicionales son necesarios para confirmar esta observación. En conclusión, los resultados presentados muestran un gran potencial de los propóleos de Sonora para el tratamiento de infecciones causadas por distintas especies del género *Vibrio*. Al incrementar nuestro conocimiento acerca de los efectos y mecanismos de acción de este producto natural, se le podrá aprovechar al máximo su capacidad antimicrobiana.

INTRODUCCIÓN

El cólera es una infección intestinal aguda causada por la ingestión de alimentos o agua contaminados con la bacteria *Vibrio cholerae*. Se produce una diarrea copiosa, indolora y acuosa que puede conducir con rapidez a una deshidratación grave y a la muerte si no se trata oportunamente (OMS, 2012b).

La enfermedad del cólera representa aún una amenaza mundial. Si bien no supone una amenaza para los países que garantizan una mínima higiene, la enfermedad sigue siendo un reto para los países que no pueden asegurar el acceso a agua potable y un saneamiento adecuado. Casi todos los países en desarrollo tienen que hacer frente a brotes de cólera o a la amenaza de una epidemia de la enfermedad (OMS, 2012). Aunado a lo anterior, la facilidad de viajar por muchos de estos países endémicos de la enfermedad y a la aparición de cepas drogo-resistentes, hacen difícil el control de este padecimiento. Es importante mencionar que también las catástrofes causadas por la naturaleza como los ciclones, huracanes y terremotos, pueden propiciar un brote de esta enfermedad debido a que la población queda momentáneamente sin los correctos servicios públicos, como el agua potable y/o atención médica.

En los últimos años se ha hecho un esfuerzo por encontrar distintas fuentes para el tratamiento de enfermedades infecciosas causadas por microorganismos tales como *Salmonella* sp., *Shigella* sp., *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Vibrio cholerae* que han logrado desarrollar resistencia a diversos fármacos. Es precisamente la aparición de estas cepas resistentes a las drogas que normalmente utilizamos, lo que ha hecho que se busquen remedios naturales como los ofrecidos por las plantas y diversos insectos para la terapia antibiótica (Domingo y López-Brea, 2003).

La búsqueda de nuevos antimicrobianos naturales ha dado como resultado el descubrimiento de los mecanismos de protección que tienen los

propóleos, un producto resinoso elaborado por las abejas a partir de los exudados que recogen de la vegetación circundante a la colmena. Es una sustancia fuertemente adhesiva con una alta eficiencia antiséptica y con propiedades como la antibacteriana, antitumoral, hepatoprotectora, antifúngica, entre otras (Al-Hariri, 2011).

Existen diversos estudios que demuestran la importante actividad antimicrobiana que presentan los propóleos de distintas regiones del mundo, ya sea por sí solos o en conjunto con otros productos, y que indudablemente tienen un efecto sobre distintos microorganismos (Al-Waili y col., 2012; Mavri y col., 2012; Choudhari y col., 2012).

Es por lo anterior que ha habido un creciente interés por estos productos naturales y sus propiedades biológicas. Así, el estudio de los propóleos de nuestra región, específicamente de su actividad antibacteriana, es el centro de atención del presente trabajo. Para ello se utilizaron muestras de propóleos recolectadas en las distintas épocas del año de la región de Ures, Sonora.

ANTECEDENTES

Generalidades de Diferentes Especies de *Vibrio*

Las bacterias pertenecientes al género *Vibrio* han jugado un papel importante en la historia humana. Se les conoce por vivir en ambientes acuáticos y causar distintas lesiones ya sea en humanos o en animales. Dentro del género *Vibrio* existen aproximadamente once especies que son patógenas para el hombre (West, 1989). Aquellas consideradas de importancia médica son *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus* (West, 1989; Thompson y col., 2006). Otros organismos implicados como patógenos oportunistas son *V. alginolyticus*, *V. fluvialis*, *V. mimicus*, entre otros (West, 1989).

Vibrio parahaemolyticus es una bacteria marina causante de gastroenteritis debido a la ingestión de mariscos infectados. Los pacientes afectados por el microorganismo presentan una diarrea acuosa, acompañada por sangre y mucosidad (Thompson y col., 2006; Chen y col., 2011; West, 1989).

Vibrio alginolyticus era considerado anteriormente como un biotipo de *V. parahaemolyticus*, pero se propuso que era una especie diferente basándose en la fermentación de la sacarosa y otras características fenotípicas (Thompson y col., 2006). Fue en 1973 el año en que se consideró por vez primera a *V. alginolyticus* como patógeno humano, predominando en ambientes marinos y que se ha aislado de infecciones de tejido localizado como cortadas o infecciones de oído (Thompson y col., 2006; Oliver, 2005).

La bacteria *Vibrio vulnificus* es un microorganismo capaz de causar infecciones que ponen en riesgo la vida de personas que tengan una condición pre disponente como afecciones en el hígado o un sistema inmunológico comprometido. La infección por este microorganismo patógeno puede resultar

de la ingestión de mariscos contaminados o por la exposición de alguna herida abierta a aguas contaminadas con *Vibrio vulnificus*. Las heridas infectadas pueden progresar a un edema, celulitis, hasta una fascitis necrosante; mientras que la infección por alimentos contaminados, puede rápidamente progresar a una septicemia primaria cuyos síntomas pueden ser fiebre alta, disminución en la presión sanguínea, hasta un choque séptico (Jeong y col., 2012).

Vibrio fluvialis se distribuye de amplia manera en ambientes acuáticos, heces fecales de humanos y animales, drenaje y productos marinos (Thompson y col., 2006; Igbinosa y col., 2010), y es una importante causa de diarreas sanguinolentas parecidas al cólera, así como de infecciones en heridas con una septicemia primaria en pacientes inmunocomprometidos, especialmente en áreas con un deficiente sistema sanitario (Igbinosa y col., 2010).

Descrito en un inicio como una cepa bioquímicamente atípica de *Vibrio cholerae* (Hasan y col., 2010), *V. mimicus* es similar a la anterior, particularmente a los serotipos no O1 y no O139, pues comparten la mayoría de sus procesos bioquímicos y algunos antígenos O. Sobrevive bien en aguas de ríos, lagos, estanques y ambientes estuarinos, por lo que se puede encontrar asociado a zooplancton, crustáceos, moluscos, huevos de tortuga y pescado. Las infecciones se dan por ingesta de mariscos contaminados o por la exposición a cualquiera de los elementos antes mencionados (Thompson y col., 2006; Hasan y col., 2010).

Todas las bacterias que se han citado hasta ahorita suponen una importancia clínica para el ser humano, pero es *Vibrio cholerae* la especie de interés tanto para este trabajo como para el sector salud, puesto que es la responsable de las pandemias que se han vivido a lo largo del tiempo (Murray y col., 2000).

Generalidades de *Vibrio cholerae*

Vibrio cholerae es un bacilo curvo Gram negativo en forma de coma, de 2 a 4 µm de longitud que posee un único flagelo polar que le confiere una motilidad activa. Bioquímicamente se caracteriza por dar positiva la prueba de la oxidasa, siendo ésta una etapa clave en la identificación preliminar de *V. cholerae* y otros vibriones. Es una bacteria anaerobia facultativa que fermenta la sacarosa y la manosa, pero no la arabinosa (Brooks y col., 2000).

La estructura de la membrana externa de los vibrios también es relevante. El polisacárido O se emplea para subdividir las especies de *Vibrio* en serogrupos: se han definido más de 140 serogrupos de *V. cholerae* (O1-O140). Los serogrupos O1 y O139 de *V. cholerae* sintetizan la toxina colérica y se asocian a la aparición de epidemias. El serogrupo O1 de *Vibrio cholerae* se subdivide, a su vez, en serotipos y biotipos: se han reconocido los serotipos Inaba, Ogawa e Hikojima. Se han definido dos biotipos de *V. cholerae* O1: clásico y El Tor. Las cepas causantes de la sexta pandemia mundial correspondían al biotipo clásico, mientras que casi todas las implicadas en la séptima y actual pandemia son del biotipo El Tor (Murray y col., 2000).

Vibrio cholerae es el responsable de provocar cólera, enfermedad caracterizada por diarreas profusas. Las evacuaciones, parecidas a “agua de arroz”, contienen, entre otras cosas, un gran número de vibriones y se presenta pérdida rápida de líquidos y electrolitos que conduce a la deshidratación profunda, colapso circulatorio y anuria. Sin tratamiento, la tasa de mortalidad es de 25 a 50% (Brooks y col., 2000).

El Cólera y los Antibióticos

La Organización Mundial de la Salud reporta que de las 10 principales causas de mortandad en el mundo al año 2008, las enfermedades diarreicas ocupan el

5° lugar con un estimado de 2.46 millones de muertes, es decir, el 4.3% de la población mundial. Dicha cifra es considerada de especial interés, ya que las enfermedades diarreicas estaban consideradas como una afección mínima que aquejaba a la población, situación que ha provocado un renovado interés en el control y prevención de dichas enfermedades (Tabla I) (WHO, 2008).

Más aún, la OMS ha establecido que la actual pandemia de cólera abarca países como América Latina, India, Europa, Estados Unidos de Norteamérica y África, siendo este último el más afectado dadas las condiciones tan escasas de higiene y la ausencia de un efectivo sistema de agua potable (WHO, 2001). La gran accesibilidad de viajar a sitios en donde existe una alta incidencia de cólera y la resistencia a diversos antibióticos que los microorganismos han desarrollado, hacen difícil el control de esta enfermedad en todo el mundo. Las infecciones respiratorias agudas y diarreicas, en conjunto con el sarampión, el paludismo y la tuberculosis, son la causa de mortalidad en más del 85% de los casos por infección reportados en el mundo (WHO, 2001). Es preciso entonces, encontrar una fuente alternativa de tratamiento, es decir, de nuevos antimicrobianos, pues se reporta que la contención del cólera se ha visto truncada por la resistencia que cepas del agente patógeno han logrado formar contra cloranfenicol, doxiciclina, estreptomina, sulfonamidas y tetraciclinas, entre otras. Más aún, la OMS hace referencia que se necesitan antibióticos más efectivos para reducir el tiempo y costo de los tratamientos, disminuir la duración del padecimiento y salvar vidas, en vista de que las cepas drogo-resistentes siguen suponiendo una amenaza en los brotes de epidemias (Sack y col., 2001).

La principal herramienta para el tratamiento y prevención de las diversas enfermedades infecciosas bacterianas en humanos y animales son los antibióticos. Sin embargo, éste no es su único uso: también son desinfectantes

Tabla I. Las 10 principales causas de muerte en el mundo en el 2008. Organización Mundial de la Salud, 2008.

Mundial	Muertes en millones	% de muerte
Enfermedades cardíacas coronarias	7.25	12.8
Embolias y otras enfermedades cerebro-vasculares	6.15	10.8
Infecciones del aparato respiratorio bajo	3.46	6.1
Enfermedades pulmonares obstructivas crónicas	3.28	5.8
Enfermedades diarreicas	2.46	4.3
VIH/SIDA	1.78	3.1
Cáncer de tráquea, bronquitis o pulmones	1.39	2.4
Tuberculosis	1.34	2.4
Diabetes mellitus	1.26	2.2
Accidentes viales	1.21	2.1

de diversos materiales en los hospitales y son empleados en la conservación de alimentos, entre otros.

En general, los fármacos empleados en las terapias para combatir las diversas enfermedades (incluidos los antibióticos) son elaborados por síntesis química y a partir de fuentes naturales. Así pues, la naturaleza ha sido la encargada de proveernos de los componentes antimicrobianos necesarios; pero por el descubrimiento de bactericidas de distinto origen, como el fúngico a mediados del siglo pasado, cesó la búsqueda de fuentes botánicas.

Propóleos

El interés de utilizar extractos de plantas como una fuente alternativa para conservar la salud retomó su fuerza a finales del siglo XX. Las plantas sintetizan más de 100,000 metabolitos secundarios, algunos de los cuales poseen actividad antimicrobiana (Domingo y López-Brea, 2003), posteriormente secretan algunos de estos metabolitos en las hojas y en los brotes con el objeto de protegerse de la luz ultravioleta, de los hongos e insectos (Grunberger y col., 1988). Estas secreciones son recolectadas por las abejas (*Apis mellifera*) y las mezclan con otros componentes para formar lo que se conoce como propóleos (Castaldo y Capasso, 2002). Estos representan una fuente importante de productos antibacterianos.

Las resinas, que activamente secretan y exudan las distintas plantas cercanas a la colmena, son recolectadas por las abejas y las mezclan con cera para formar los propóleos. Así pues, la composición de este producto depende de la vegetación del área donde fue recolectado (Banksota y col., 2000). Las abejas le dan diversos usos: es empleado para tapar fisuras, pegar las partes móviles de la colmena, y más importantemente, como desinfectante y antibiótico. Por ejemplo, lo usan como recubrimiento de los paneles antes de la puesta de los huevos por parte de la reina para desinfectar la zona donde se

desarrollarán las nuevas abejas. El ser humano ha utilizado a los propóleos de diversas maneras que van desde la desinfección bucal, como complemento dietético, hasta estar presentes en productos biocosméticos.

Investigaciones recientes han demostrado que los propóleos presentan actividad antibacteriana, antiviral, antifúngica, antiinflamatoria, antitumoral, hepatoprotectora y antioxidante de los propóleos (Bankova, 2005; Al-Hariri, 2011). Debido a que estos mecanismos de defensa son dependientes de la constitución química de dichos productos naturales, se ha despertado una situación de creciente interés en la profundización del estudio de estos compuestos naturales. Como lo reportan Banksota y colaboradores (2000), las abejas recolectan los componentes necesarios para la elaboración de los propóleos de la vegetación cercana a la colmena dentro de un perímetro de 3 a 4 km a la redonda. Por lo anterior, se dice que son las distintas características fitogeográficas lo que le confiere una gran diversidad a la constitución química de lo propóleos.

Hay reportes en donde se han identificado más de 180 compuestos distintos de los propóleos estudiados (Castaldo y Capasso, 2002). De una manera general, el 50% son resinas y aceites volátiles, 30% cera, 10% aceites aromáticos, 5% polen y 5% de otras sustancias. Los propóleos de distintas regiones presentan altas concentraciones de flavonoides, componente de especial interés para este trabajo.

Bankova (2005) describe que los propóleos provenientes de regiones europeas deben su poder antibacteriano a componentes tales como ácidos y ésteres, a derivados del ácido cafeico y a algunos flavonoides como pinocembrina, acetato de pinobanksina, pinobanksina, entre otros. Este mismo estudio reporta que los propóleos cubanos deben su efecto antibacteriano frente a bacterias Gram positivas y negativas a las benzofenonas preniladas que posee.

Los propóleos de diferentes áreas geográficas, tales como Bulgaria, Egipto, Brasil, entre otros, presentan actividad antibacteriana en contra de *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli* (Kujumgiev y col., 1999). Más aún, en las investigaciones de Takaisi-Kikuni y Schilcher (1994) se muestra que los propóleos de un área definida inhiben el crecimiento bacteriano interrumpiendo la división celular. En este mismo estudio se demostró además, que los propóleos ocasionaron la desorganización del citoplasma, de la membrana citoplasmática y de la pared celular, una bacteriólisis parcial e inhibieron la síntesis de proteínas. Por todo lo anterior, es difícil asociar el mecanismo de acción de los propóleos con algún antibiótico tradicional.

En general, se han hecho estudios a cerca de propóleos en regiones que van de climas tropicales hasta zonas templadas (Kujumgiev y col., 1999; Popova y col., 2002; Mavri y col., 2012), como son las regiones de Europa, Asia y Sudamérica principalmente, pero muy pocos son los desarrollados en zonas desérticas o áridas y semiáridas (Velázquez y col., 2007; Hernández y col., 2007) de México.

En el estudio realizado por Velázquez y colaboradores (2007), se probó la actividad antibacteriana de propóleos provenientes de tres provincias de Sonora: Ures, Pueblo de Álamos y Caborca, tres regiones con clima desértico. Para la evaluación del efecto inhibitor de los propóleos, se utilizaron bacterias Gram-positivas (*S. aureus*, *E. faecalis* y *L. monocytogenes*) y Gram-negativas (*E. coli* y *P. aeruginosa*). En el estudio se demostró que los propóleos de la región de Ures presentaron la mayor actividad antibacteriana, principalmente en contra de *S. aureus*, seguido de Caborca y Pueblo de Álamos. Dicho estudio estableció que la región con mayor capacidad de inhibir el crecimiento de bacterias fue Ures, cuya actividad fue en contra *S. aureus* principalmente, seguido de Caborca y por último, Pueblo de Álamos que no exhibió ningún cambio significativo. Asimismo, se ha demostrado que los propóleos

provenientes del estado de Sonora poseen compuestos capaces de neutralizar radicales libres (actividad antioxidante), determinándose que su composición química comprende principalmente constituyentes de tipo flavonoide siendo pinocembrina, pinobanksina, acetato de pinobanksina, crisina y galangina los compuestos mayoritarios presentes en las tres muestras de propóleo evaluadas. Más aún, se aislaron e identificaron los flavonoides pinocembrina, 3-O-acetato de pinobanksina y crisina de propóleos provenientes de Ures (Lugo-Sepúlveda, 2003). Todo lo anterior permite sentar las bases para el desarrollo de futuras investigaciones con el propósito de identificar y caracterizar química y biológicamente los compuestos responsables de las actividades biológicas mencionadas y de otras que serán evaluadas en un futuro.

Actualmente, dentro del mismo grupo de investigación, se está llevando a cabo un estudio acerca de la inhibición que los propóleos ejercen en contra de bacterias Gram negativas *in vitro*, arrojando resultados favorables. Adicionalmente, en este mismo estudio preliminar se están probando propóleos obtenidos en las cuatro distintas épocas del año, esto con el objetivo de conocer si hay alguna diferencia entre las muestras. Partiendo de este esquema es que se pretende estudiar el poder inhibidor de los propóleos Sonorenses en contra de bacterias Gram negativas *in vitro* e *in vivo* (Velázquez y col., 2007).

Temporalización de Propóleos

Diversos investigadores han estudiado los principales componentes que constituyen a los propóleos (Popova y col., 2010; Park y col., 2002; Feng y col., 2010). Hay diversas opiniones acerca de la variabilidad en la composición de los propóleos a lo largo del año. Isla y colaboradores (2009) reporta que los propóleos de una región de Argentina poseen un alto poder antioxidante y que la mejor época para la recolección de dicho producto natural es de Octubre a Diciembre, pues es en este período que se registraron los contenidos más altos

de compuestos fenólicos. Simoes-Ambrosio y colaboradores (2010) explica en su trabajo que los propóleos obtenidos en el mes de Marzo, que corresponde al comienzo del otoño en Brasil, exhibió un mayor efecto inhibitorio del proceso oxidativo de neutrófilos que aquellos propóleos producidos en el verano, presentando una variación de la IC₅₀ de 16.1 µg/mL a 7.0 µg/mL. Aún más, en el estudio hecho por Teixeira y colaboradores (2010), se comprueba que las muestras de propóleos recolectadas mensualmente por un periodo de un año, revelaron una composición química considerablemente diferente. De igual manera, se probó la actividad antibacteriana de los propóleos de Brasil de las diferentes estaciones del año frente a bacterias como *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E coli* y *S. typhimurium*, llegando a la conclusión que dichos propóleos tienen una actividad bacteriostática (Sforcin y col., 2000).

Es por lo anterior que en el presente trabajo se pretende establecer el precedente de la actividad que puedan presentar los propóleos sonorenses en las diferentes estaciones del año (Valencia y col., 2012).

Modelo Murino de Infección

El modelo de estudio animal por excelencia es el ratón. El modelo murino ha sido el más estudiado, lo que permite poner en perspectiva diferentes procesos biológicos. Al conocer que *Vibrio cholerae* coloniza el intestino delgado de los humanos, se han utilizado muchos modelos animales con el objetivo de simular la enfermedad y así poder estudiar la patogénesis del cólera (Klose, 2000). Pero debido a que no todos los modelos animales son susceptibles a la colonización por el patógeno causante del cólera, se tuvo que buscar alguno, resultando el modelo murino el más adecuado para el establecimiento de la enfermedad. Existen muchas publicaciones que utilizan a los ratones como modelo de infección para *V. cholerae*, pero específicamente son los ratones infantiles los más susceptibles a dicha infección (Baselski y col., 1977; Kim y

Taylor, 2005; Angelichio y col., 1999), argumentándose que ésta es posiblemente debida al sistema de defensa tan pobre que posee su organismo. La gran ventaja de utilizar un modelo murino infante de infección es que *Vibrio cholerae* es capaz de expresar factores de virulencia en el intestino de los ratones que se saben son importantes en la patogénesis de la infección producida en los humanos, indicando así, que en éste modelo animal se puede imitar la enfermedad, al menos hasta cierto grado (Klose, 2000).

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras de Propóleos

Las muestras se recolectaron de colmenas ubicadas en Ures de la temporada 2008-2009 (Tabla II). Dichas muestras se conservaron a -20°C y en oscuridad.

Obtención de Extractos Metanólicos de Propóleos

A cien gramos de propóleos crudos se les añadieron 300 mL de metanol grado reactivo y se dejaron reposar por 24 h a 40°C. La solución se filtró con gasa y el metanol se evaporó a presión reducida en un rotavapor. El extracto metanólico de propóleos (EMP) se secó en un horno al vacío a 40°C y posteriormente se almacenó en la oscuridad a -20°C (Navarro, 2007; Salomao y col., 2004).

Efecto de Propóleos Sobre el Crecimiento Bacteriano

Solución Concentrada de EMP

Cuarenta mg de EMP o compuesto puro se llevaron a un volumen final de 1 mL con dimetilsulfóxido (DMSO) para obtener una concentración final de 40 mg/mL.

Solución de Trabajo de EMP

A partir de las soluciones concentradas se realizaron diluciones en caldo Müeller-Hinton (CMH), o caldo Tripticasa Soya con 2% de NaCl para obtener soluciones de trabajo de 400.0, 200.0, 100.0 y 50.0 µg/mL (Navarro, 2007).

Tabla II. Coordenadas y plantas predominantes del lugar de recolección de propóleos (Valencia y col., 2012).

Lugar de recolección	Coordenadas	Plantas predominantes
Ures	N29°27'W110°22'	<i>Olneya tesota</i> <i>Prosopis velutina</i> <i>Populus fremontii</i> <i>Cercidium microphyllum</i> <i>Bursera laxiflora</i> <i>Celtis palida</i> <i>Guaiacum coulteri</i> <i>Jatropha cardiophylla</i> <i>Lysiloma divaricata</i>

Inóculo Bacteriano

Se preparó en una solución salina estéril, a partir de un desarrollo de 12 horas en agar Müeller-Hinton o agar Trypticase Soya con 2% de NaCl, hasta lograr una densidad óptica (DO) a 620 nm de 0.095 ± 0.005 , igual a la lectura de DO del estándar 0.5 de MacFarland. El inóculo equivale a 10^8 UFC/mL (Jorgensen y col., 1999). Las lecturas se realizaron en un lector de microplacas BioRad-Benchmark (Apéndice I).

Determinación *in vitro* del Efecto Anti-vibrio

Se tomaron por triplicado 200 μ L de cada una de las concentraciones de los propóleos o del compuesto puro y se depositaron en microplacas de 96 pozos de fondo plano. A un conjunto de estos pozos se les adicionó el inóculo bacteriano y se preparó otro conjunto sin bacterias. Además se prepararon tres pozos con 200 μ L de caldo de cultivo conteniendo al antibiótico gentamicina (20 μ g/mL), tres pozos con 200 μ L de caldo de cultivo con la máxima concentración del solvente al que las bacterias están expuestas en los pozos de prueba, y tres más con caldo de cultivo como control de esterilidad. Los pozos de prueba y los controles se inocularon con 15 μ L de la suspensión bacteriana previamente estandarizada. Después de la inoculación, la placa se incubó a 36°C y se leyó la densidad óptica a 620 nm (DO_{620}) de los pozos a las 0, 6, 12, 24 y 48 horas. Con las lecturas se realizaron curvas de desarrollo bacteriano, graficando tiempo Vs DO_{620} (Jorgensen y col., 1999). Para obtener la concentración mínima inhibitoria (MIC_{90}), que se define como la concentración más baja de propóleos que inhibe al menos el 90% del desarrollo bacteriano después de 24 h a 36°C, se aplicó la fórmula: $(DO_{620} \text{ bacterias sin tratamiento} - DO_{620} \text{ concentración de prueba}) / DO_{620} \text{ bacterias sin tratamiento} \times 100 \geq 90\%$ (Navarro, 2007; Baizman y col., 2000) (Apéndice II).

Cepas Bacterianas

Se ensayaron cepas de colección de *S. aureus* y *E. coli* donadas por el Laboratorio de Microbiología del Departamento de Ciencias Químico Biológicas de la Universidad de Sonora y distintas cepas del género *Vibrio* donadas por el Laboratorio Estatal de Salud Pública (Tabla III).

Determinación *in vivo* del Efecto Anti-vibrio

Para establecer el modelo murino de infección para *Vibrio cholerae*, nos basamos en el trabajo de Angelichio y colaboradores (1999). Se preparó un cultivo de 18 horas en caldo Soya Trypticasa con 2% de NaCl de las distintas cepas a probar con el consiguiente lavado del mismo en una solución reguladora de fosfatos. Para dicho lavado se centrifugó el cultivo tres veces a 3000 xg por 20 minutos cada ciclo. Enseguida se procedió a estandarizar el inóculo para obtener uno de 2×10^7 UFC/mL. Este inóculo se depositó intragástricamente a ratones de la cepa CD1 de 4 a 5 días de nacidos, en un volumen total de 50 μ L de un buffer de fosfatos estéril. Posteriormente, se sacrificaron por dislocación cervical a las 24 horas de incubación, con la consiguiente extracción y homogenización de los intestinos. Dicho homogenizado se filtró utilizando gasa estéril y posteriormente se realizaron diluciones 1:10, 1:100 y 1:1000. Se tomaron 20 μ L de cada una de estas diluciones y se sembraron de manera masiva en placas con agar TCBS para el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC).

El siguiente paso después de la estandarización de la infección, es la determinación de la inhibición del crecimiento de *Vibrio cholerae in vivo*. Se formaron 3 grupos de 5 ratones cada uno de la cepa CD1 de 4 a 5 días de nacidos. A los tres grupos se les infectó con 50 μ L del agente patógeno en estudio (2×10^7 UFC/mL) en solución reguladora de fosfatos estéril y a las 8 horas después de la infección se les aplicaron los distintos tratamientos. Al

Tabla III. Cepas de bacterias utilizadas.

Especies del género <i>Vibrio</i> utilizadas en el experimental
<i>V. alginolyticus</i>
<i>V. cholerae</i> no O1
<i>V. cholerae</i> O1 Inaba
<i>V. cholerae</i> O1 Ogawa
<i>V. fluvialis</i>
<i>V. mimicus</i>
<i>V. parahaemolyticus</i>

primer grupo de ratones se les suministraron los propóleos disueltos en propilenglicol en una concentración de 20 mg/mL, es decir, 1 mg a cada ratón. Al segundo grupo se les dieron únicamente 50 μ L de propilenglicol como control de solvente. Al tercer grupo se les administraron 50 μ L de la solución reguladora de fosfatos. Así mismo, se conservó un ratón sano para el control negativo de crecimiento bacteriano. Los ratones se sacrificaron a las 24 horas post infección por dislocación cervical, para después extraerles los intestinos, homogenizarlos y hacer las diluciones 1:10, 1:100 y 1:1000. Una vez hechas las diluciones, se sembraron en placas de cultivos con agar TCBS para contar las UFC presentes. Se incluyeron en el conteo de UFC aquellas colonias que presentaron una coloración amarilla sobre dicho agar.

Análisis Estadístico

Para los ensayos *in vitro* se realizó estadística descriptiva calculando las medias y desviaciones estándar de las lecturas de densidad óptica en las curvas de desarrollo y se graficaron con el paquete Graphpad Prism V 3.02, así como también, se realizó un análisis de varianza comparando la actividad de las diferentes concentraciones de los propóleos en estudio, así como de las distintas épocas de recolección.

El análisis para las determinaciones de la inhibición *in vivo* se realizó por medio de análisis de varianza, utilizando el paquete NCSS (Number Cruncher Statistical Software) 2000. Así mismo se corrieron las pruebas de comparación múltiple de Tukey-Kramer y Duncan.

RESULTADOS

Los propóleos estudiados en el presente trabajo se recolectaron durante la temporada 2008-2009 (Valencia, 2012). Se colocaron trampas hechas con marcos de madera y mallas de plástico en las colmenas de las abejas; al final de cada temporada, se retiraron dichas trampas para su posterior refrigeración y raspado. En la tabla IV se describen las características físicas y organolépticas de los propóleos recolectados, tales como color, consistencia, aspecto físico y cantidad recolectada.

Actividad Antibacteriana *in vitro* de Propóleos Obtenidos en las Diferentes Temporadas del Año Sobre *E. coli* ATCC 25922 y *S. aureus* 6538P

Para confirmar el efecto que de los propóleos recolectados durante las diferentes estaciones del año sobre el crecimiento de bacterias Gram positivas (*S. aureus*) y Gram negativas (*E. coli*) *in vitro*, se realizaron ensayos antibacteriales utilizando el método de microdilución en caldo descrito previamente (Jorgensen y col., 1999). Todos los propóleos de Ures estudiados inhibieron significativamente el crecimiento de *S. aureus* en una manera dosis dependiente. Los propóleos que presentaron mayor actividad fueron los recolectados en las temporadas de otoño y verano (otoño [MIC₉₀ = 50 µg/mL] > verano [MIC₉₀ = 100 µg/mL] ≈ primavera [MIC₉₀ = 100 µg/mL] > invierno [MIC₉₀ = 200 µg/mL] (Figura 1, Tabla V y Apéndice III). En contraste, los extractos de propóleos mostraron una actividad inhibitoria muy baja (MIC₉₀ ≥ 400 µg/mL) sobre *E. coli* (verano > primavera ≈ otoño > invierno) (Figura 1, Tabla V y Apéndice III). Estos resultados están de acuerdo con un número significativo de publicaciones (Silva y col., 2012; Vera y col., 2011; Castro y col., 2011) en donde se establece que extractos de propóleos poseen una mayor actividad inhibitoria del crecimiento sobre bacterias Gram positivas que sobre bacterias Gram negativas.

Tabla IV. Características físicas y organolépticas de propóleos recolectados (Valencia, 2012).

Estación	Propóleos recolectados (g)	Aspecto físico	Color	Consistencia
Primavera	45	Terroso	Café-verde (ocre)	Pegajoso
Verano	245	Hojuela	Café-verde (ocre)	No pegajoso
Otoño	60	Terroso	Café-amarillo	Pegajoso
Invierno	8	Astilla	Café claro-verde	Muy pegajoso

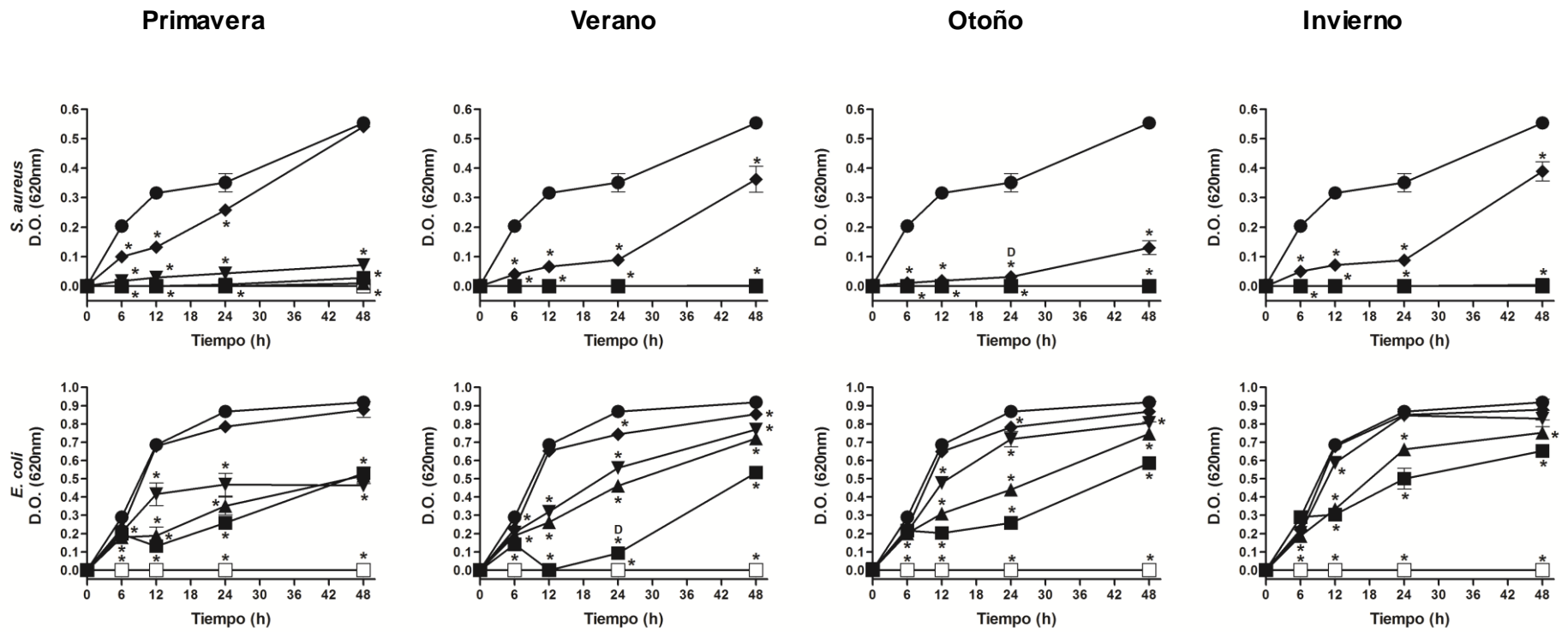


Figura 1. Efecto de propóleos recolectados en las diferentes épocas del año de la región de Ures, Sonora sobre *S. aureus* 6538P y *E. coli* 25922. (■) 400 µg/mL, (▲) 200 µg/mL, (▼) 100 µg/mL, (◆) 50 µg/mL, (●) 0.0 µg/mL, (□) Gentamicina. El asterisco representa diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.01$) entre las concentraciones evaluadas, y “D” representa la estación con mayor actividad antibacteriana.

Actividad Inhibitoria del Crecimiento de Propóleos de Ures, Sonora Sobre Diferentes Especies de *Vibrio*

En estudios realizados en nuestro grupo de investigación (Navarro-Navarro y col., 2013) se observó que propóleos recolectados en Ures, Sonora exhibieron un efecto inhibitorio significativo sobre el crecimiento de diferentes especies de *Vibrio* (Gram-negativas). En el presente trabajo se extienden esas observaciones y adicionalmente se evaluó el efecto que tiene la época de recolección de propóleos sobre la actividad de este producto natural para inhibir el crecimiento *in vitro* de las siguientes especies de *Vibrio*: *V. cholerae* no O1, *V. cholerae* O1 Inaba, *V. cholerae* O1 Ogawa, *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. mimicus* y *V. fluvialis*.

Los propóleos obtenidos en las cuatro diferentes épocas del año inhibieron de manera importante y similar el crecimiento de la mayoría de las especies de *Vibrio* estudiadas. Las cepas más susceptibles al efecto de los propóleos fueron *V. mimicus* (MIC₉₀ de 100 µg/mL para verano y otoño); *V. cholerae* no O1 a concentraciones más elevadas (MIC₉₀ de 200 µg/mL en cualquiera de las cuatro estaciones), efecto muy similar al que se observó con *V. cholerae* O1 Inaba, con la diferencia que propóleos de primavera demostraron una MIC₉₀ de 100 µg/mL. Las cepas más resistentes a la acción inhibitoria de propóleos fueron *V. alginolyticus* (MIC₉₀ de 400 µg/mL) y *V. fluvialis* (MIC₉₀ de >400 µg/mL) (Figura 2, Tabla VI y Apéndice IV).

Actividad Antibacteriana *in vivo* de Propóleos

Debido a que los propóleos obtenidos de la localidad de Ures presentaron un potente efecto inhibitorio *in vitro* sobre diferentes especies de *Vibrio*, se procedió a explorar el comportamiento que este producto natural pueda tener en un modelo murino de infección de *Vibrio cholerae*. Se utilizaron ratones de la cepa CD1 de cuatro a cinco días de nacidos. Este modelo murino de infección por *V.*

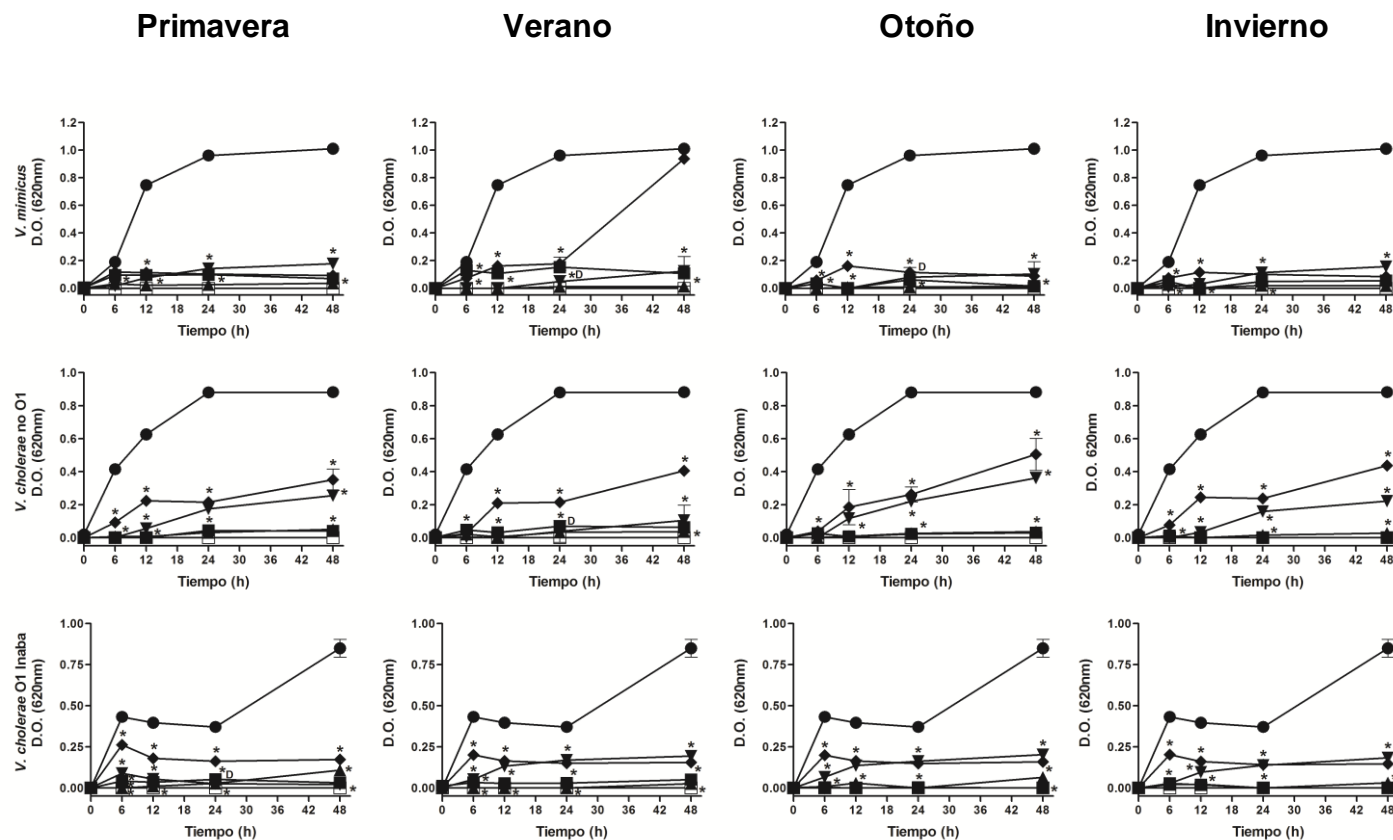


Figura 2. Efecto de propóleos recolectados en las diferentes épocas del año de la región de Ures, Sonora sobre *Vibrio* sp. (■) 400 µg/mL, (▲) 200 µg/mL, (▼) 100 µg/mL, (◆) 50 µg/mL, (●) 0.0 µg/mL, (□) Gentamicina. . El asterisco representa diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.01$) entre las concentraciones evaluadas, y "D" representa la estación con mayor actividad antibacteriana.

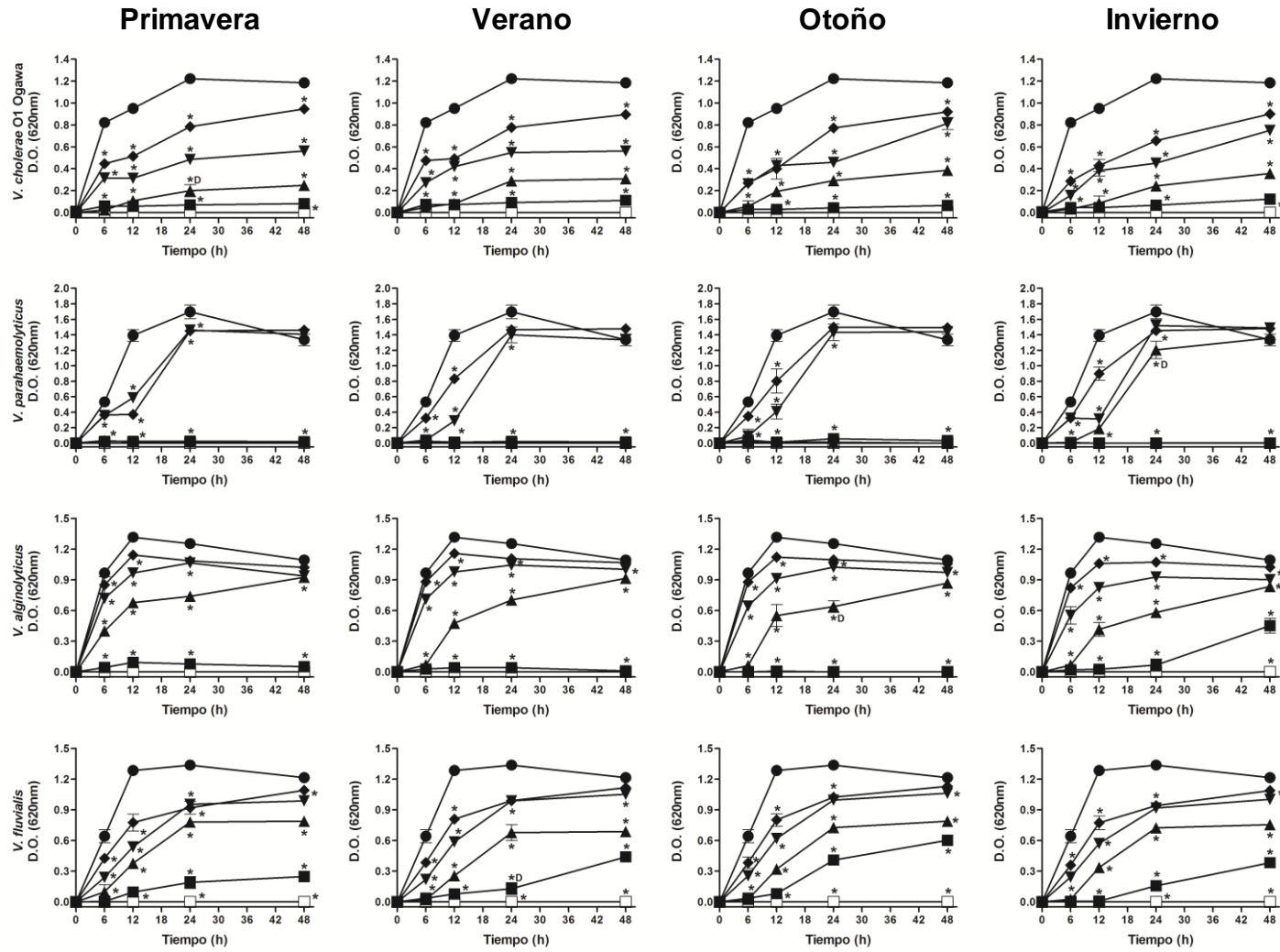


Figura 2. Continuación.

cholerae se ha reportado eficiente para numerosos estudios en la identificación y caracterización de factores de virulencia involucrados en procesos diarreicos en humanos (Klose, 2000; Oliver y col., 2007).

Como primer paso, se realizaron experimentos para seleccionar al serotipo de *Vibrio cholerae* que mejor desarrolle una infección intestinal. Para esto, se estudiaron tres serotipos de *Vibrio cholerae*: *V. cholerae* no O1, *V. cholerae* O1 Inaba y *V. cholerae* O1 Ogawa. Los resultados revelaron que *V. cholerae* no O1 y *V. cholerae* O1 Ogawa fueron incapaces de infectar de manera significativa a los ratones de la cepa CD1, en otras palabras, la recuperación de bacterias 24 horas posterior a la administración del inóculo bacteriano fue escasa o nula (Figura 3). Contrariamente, cuando se utilizó la cepa de *V. cholerae* O1 Inaba, se observaron infecciones reproducibles en los ratones, recuperándose un número alto de CFUs ($3.3 \times 10^7 \pm 3.4 \times 10^7$) por cada ratón infectado. Basado en estas observaciones, se seleccionó a *V. cholerae* O1 Inaba como la cepa bacteriana a utilizar en el modelo murino (Figura 3).

Una vez seleccionada la cepa bacteriana se procedió a estandarizar la cantidad óptima de UFC a inocular. Para ello, se probaron inóculos bacterianos que variaron de 5×10^5 a 24×10^6 UFC totales, resultando este último inóculo el que generó infecciones más eficientes y reproducibles (Figura 4).

Posteriormente se determinó qué concentración de propóleos es la correcta para ser utilizada en el modelo murino. Para ello, se emplearon concentraciones que fueron desde los 0 hasta los 500 mg/kg. Las concentraciones más altas de 100, 125, 250 y 500 mg/kg resultaron ser tóxicas para los ratones lactantes induciendo su muerte, mientras que ratones tratados con concentraciones de propóleos de 25 y 55 mg/kg mostraron una sobrevivencia semejante al grupo de animales tratados con PBS o propolenglicol (solvente utilizado para disolver los propóleos) (Figura 5).

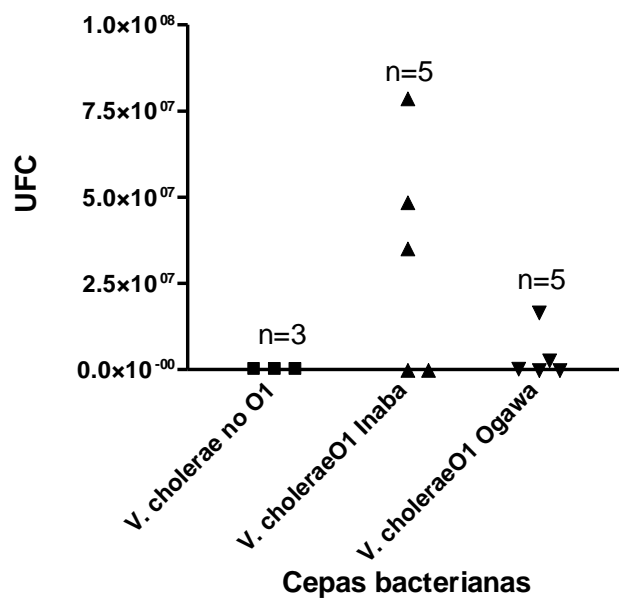


Figura 3. Relación de la cepa bacteriana con respecto a la recuperación de UFC de los intestinos del ratón lactante. Cada figura simboliza un individuo.

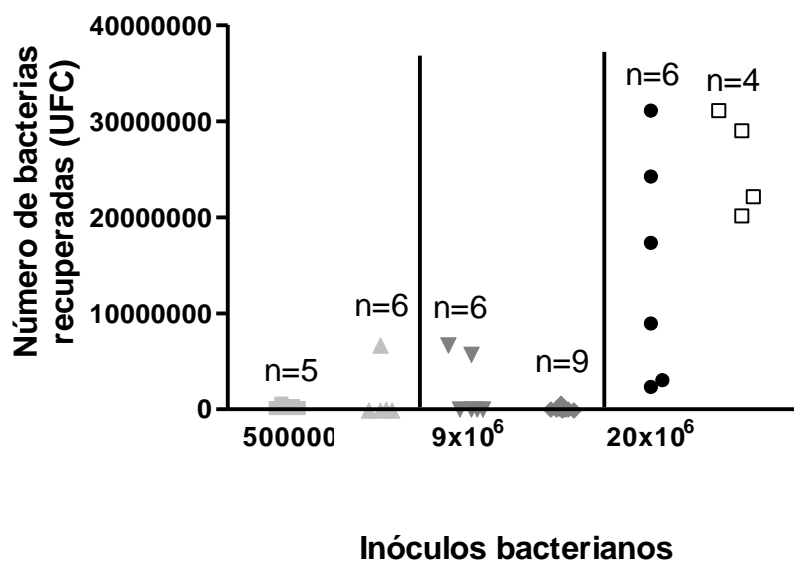


Figura 4. Efecto del tamaño del inóculo de *V. cholerae* O1 Inaba en el grado de infección. Recuperación de unidades formadoras de colonias totales de *V. cholerae* O1 Inaba del intestino de ratones lactantes, utilizando tres diferentes inóculos estandarizados. Los resultados son representativos de al menos dos experimentos independientes.

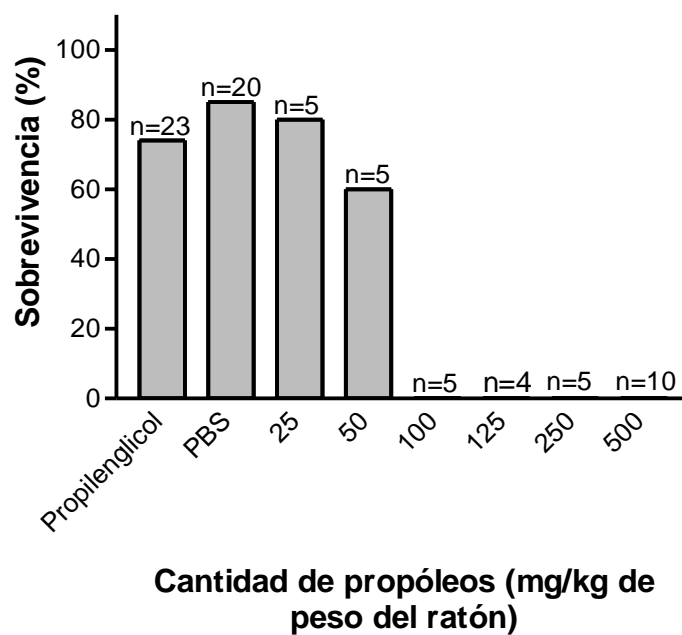


Figura 5. Efecto de la cantidad de propóleos en la supervivencia del ratón. PBS, solución reguladora de fosfatos.

Una vez establecidas las condiciones experimentales óptimas, se procedió a realizar los ensayos *in vivo*. Grupos de ratones (n=5) fueron inoculados con 2×10^7 UFC de *Vibrio cholerae* O1 Inaba y a las 8 horas post infección, fueron tratados con PBS, propilenglicol o propóleos (25 mg de propóleos/kg de peso del ratón ó 0.1 mg de propóleos por cada ratón). El grupo de ratones tratados con propóleos mostró un número de UFC recuperadas significativamente menor ($1.74 \times 10^5 \pm 1.1 \times 10^5$) que los grupos control (propilenglicol [$1.4 \times 10^6 \pm 1.4 \times 10^5$], PBS [$1.9 \times 10^6 \pm 3.1 \times 10^5$])

Estos resultados son considerados preliminares y sugieren que los propóleos de Ures, Sonora, poseen una importante actividad antibacteriana *in vivo* en contra de *Vibrio cholerae* O1 Inaba (Figura 6).

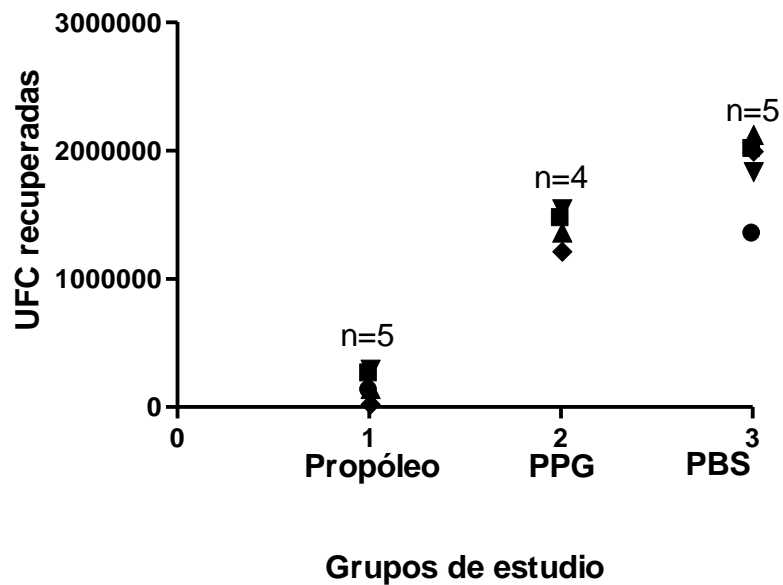


Figura 6. Efecto de propóleos de Ures, Sonora sobre el crecimiento de *Vibrio cholerae* O1 Inaba. Recuperación de UFC de los intestinos de ratones lactantes en los diferentes grupos de estudio. PPG, propilenglicol; PBS solución reguladora de fosfatos.

DISCUSIÓN

En el presente trabajo se evaluó la actividad antibacteriana *in vitro* de los propóleos recolectados en la región de Ures, Sonora, en las distintas épocas de la temporada 2008-2009, contra dos cepas representativas de bacterias Gram positivas (*S. aureus*) y Gram negativas (*E. coli*), obteniendo resultados que son congruentes con distintas publicaciones que demuestran que el efecto antibacterial de los propóleos es principalmente en contra de bacterias Gram positivas (Kujumgiev y col., 1999; Pepeljnjak y Kosalec, 2004; Uzel y col., 2005).

Sin embargo, el trabajo realizado por Navarro-Navarro y colaboradores (2013), demostró que los propóleos provenientes de Ures, tuvieron un impacto significativo en la inhibición del crecimiento de diferentes especies de *Vibrio*. Ya que éstas pertenecen a la clasificación de Gram negativas, en este trabajo se profundizó en el estudio del comportamiento de los propóleos contra bacterias pertenecientes al género antes mencionado. Los resultados aquí obtenidos demostraron que los propóleos de Ures, Sonora, inhibieron de manera importante la mayoría de las cepas pertenecientes al género *Vibrio*, resultando ser *V. mimicus* la más susceptible (MIC₉₀ de 100 µg/mL), seguida de *V. cholerae* no O1 y *V. cholerae* O1 Inaba (MIC₉₀ de 200 µg/mL).

El comportamiento antibacterial de los propóleos recolectados en las distintas temporadas fue estadísticamente distinta (Apéndice V), situación que concuerda con los resultados de actividades antiproliferativa y antioxidante (Valencia y col., 2012). Como se observaron distintos comportamientos anti-*Vibrio* de los propóleos recolectados en el desierto de Sonora, una explicación puede ser que presentan una composición distinta, sea cualitativa o cuantitativa, con respecto a muestras recolectadas de zonas similares a ésta, por la flora nativa del lugar (Nakamura y col., 2010). Con respecto a lo anterior,

Simoes-Ambrosio y col. (2010) reporta en su trabajo que la época de recolección de los propóleos no cambia significativamente la composición química de éstos en su perfil cualitativo cromatográfico, pero que sí puede influenciar en el perfil químico cuantitativo de éste producto natural. Adicionalmente, en el estudio conducido por Hernández y colaboradores (2007), se describe que CAPE (éster fenético del ácido caféico) tiene una fuerte actividad antibacteriana contra de *S. aureus* y que solo está presente en muestras obtenidas de la región de Ures, Sonora; Navarro-Navarro y colaboradores (2013) demostraron que CAPE es uno de los compuestos puros con mayor actividad anti-*Vibrio*, precedido por el flavonoide galangina. Por lo tanto, CAPE está jugando un papel muy importante en las muestras de propóleos de Ures, Sonora en la inhibición bacteriana. No hay que perder de vista que la caracterización de los propóleos de Ures no ha sido concluida; aún quedan componentes por identificar y que pueden estar contribuyendo a este efecto inhibidor del crecimiento bacteriano. Además, falta dilucidar los mecanismos de acción de los propóleos en contra de las distintas especies bacterianas, si su acción se ejerce a nivel estructural de la célula o quizá interrumpiendo algún proceso metabólico.

Con base en los resultados anteriores y para complementar el trabajo, también se llevaron a cabo determinaciones *in vivo* de la actividad inhibitoria que presentan los propóleos de Ures. Para ello, se utilizó un modelo lactante de ratón de la cepa CD-1. Se seleccionó este modelo animal porque posee un sistema inmunológico inmaduro que facilita la colonización del agente patógeno en el intestino de estos roedores (Klose, 2000; Baselski y col., 1977; Kim y Taylor, 2005; Angelichio y col., 1999). La cepa bacteriana utilizada fue *V. cholerae* O1 Inaba, pues fue la que presentó la infectividad más alta entre las cepas analizadas (*V. cholerae* no O1 y *V. cholerae* O1 Ogawa). Muy probablemente *V. cholerae* no O1 no logró invadir el intestino debido a la ausencia de la toxina colérica, mientras que *V. cholerae* O1 Ogawa puede ser

una cepa menos virulenta que la cepa del serogrupo Inaba. En el estudio llevado a cabo por Olivier y colaboradores (2007), se reporta que la colonización prolongada por parte de cepas de *V. cholerae* pertenecientes al biotipo El Tor, depende de la presencia de toxinas accesorias como hemolisinas, toxina RTX y hemaglutininas/proteasas.

Para encontrar la concentración adecuada de propóleos a utilizar, primeramente nos basamos en trabajos publicados (Dantas y col., 2006; Yousef y col., 2009; Pagliarone y col., 2009; de Barros y col., 2007) cuyas relaciones cantidad de propóleos/peso de ratón, variaron entre los 25 hasta los 500 mg/kg. Debido a que el peso promedio de los ratones lactantes fue de 4 gramos, al utilizar las cantidades anteriores, resultaron tóxicas para los animales resultando en una mortalidad de hasta el 100% en los grupos a los que se les administraron los propóleos. En posteriores experimentos se observó que a partir de la relación de 50 mg/kg, la tasa de supervivencia de los roedores aumentó, siendo la relación de 25 mg/kg en donde casi el 100% de los ratones por grupo sobrevivió.

Finalmente, al llevar a cabo el experimento, se observó que la cantidad de UFC/mL recuperadas del grupo de ratones a los que se les administró el propóleos, disminuyó significativamente con respecto a los grupos control, siendo este resultado muy sugestivo con respecto a la actividad anti-*Vibrio* de los propóleos de Ures en un sistema *in vivo*. Nuevamente, se necesitan de mas investigaciones acerca de cómo es que los propóleos actúan, más todavía en un sistema vivo, en donde la cantidad de variables es mucho más grande al igual que los posibles resultados. Sin embargo, de los 3 experimentos que se realizaron bajo las mismas condiciones de inóculo, concentración de propóleos, cantidad de sujetos por grupo, etc, sólo en uno de ellos se observó dicho comportamiento, por lo que este resultado no es concluyente y solo se podría catalogar como un estudio preliminar. De cualquier manera, estos datos nos

alientan a seguir indagando el comportamiento antibacterial *in vivo* que tienen los propóleos de la región de Ures, Sonora, utilizando este modelo murino de infección bacteriana.

De manera general, los resultados aquí obtenidos demuestran que los propóleos de Sonora, presentan un gran potencial para el tratamiento de infecciones causadas por distintas especies bacterianas. Al entender bien los mecanismos de acción que presentan dichos productos naturales, se les podrá aprovechar al máximo su capacidad protectora.

CONCLUSIONES

- Los propóleos de Ures, Sonora, recolectados en las cuatro estaciones del período 2008-2009, inhiben el crecimiento de distintas especies del género *Vibrio*.
- Existen diferencias estadísticamente significativas en la actividad antibacteriana de los propóleos recolectados en las distintas temporadas.
- Se establecieron las condiciones experimentales para evaluar el efecto de los propóleos *in vivo* en ratones lactantes de la cepa CD-1.
- Observaciones preliminares nos permiten sugerir que los propóleos de Ures, Sonora, recolectados en la temporada de verano, tienen un efecto en el crecimiento *in vivo* de *Vibrio cholerae* O1 Inaba.

BIBLIOGRAFÍA

- Al-Hariri M.T. 2011. Propolis and its direct and indirect hypoglycemic effect. *Journal of Family and Community Medicine* 18(3):152-4.
- Al-Waili N., Al-Ghamdi A., Al-Attal Y., Salom K. 2012. Synergistic effects of honey and propolis toward drug multi-resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans* isolates in single and polymicrobial cultures. *International Journal of Medical Sciences*, 9(9):793-800.
- Angelichio M.J., Spector J., Waldor M.K., Camilli A. 1999. *Vibrio cholerae* intestinal population dynamics in the suckling mouse model of infection. *Infection and Immunity*, 67:3733-3739.
- Baizman E.R., Branstrom A.A., Longley C.B., Allanson N., Sofía M.J., Gange D., Goldman R.C. 2000. Antibacterial activity of synthetic analogues based on the disaccharide structure of moenomycin, an inhibitor of bacterial transglycosylase. *Microbiology (UK)*, 146:3129-3140.
- Bankova V. 2005. Recent trends and important developments in propolis research. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*, 2:29-32.
- Banksota A., Tezuk Y., Midorikawa K., Matsushige K., Kadota S. 2000. Two novel cytotoxic Benzofuran derivatives from Brazilian propolis. *Journal of Natural Products*, 63:1277-1279.
- Baselski V., Briggs R., Parker C. 1977. Intestinal Fluid Accumulation Induced by Oral Challenge with *Vibrio cholerae* or Cholera Toxin in Infant Mice. *Infection and Immunity*, 15:704-712.
- Brooks G.F., Butel J.S., Morse S.A. 2000. Microbiología Médica de Jawetz, - Melnick y Adelberg, Manual Moderno, 16ª. Edición. Págs 291-293.
- Castaldo S., Capasso F. 2002. Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*, 73(Suppl. 1):S1-S6.

- Castro M.L., Vilela W.R., Zauli R.C., Ikegaki M., Rehder V.L., Foglio M.A., de Alencar S.M., Rosalen P.L. 2011. Bioassay guided purification of the antimicrobial fraction of a Brazilian propolis from Bahia state. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 30(9):25.
- Chen Y., Stine O.C., Badger J.H., Gil A.I., Nair G.B., Nishibuchi M., Fouts D.E. 2011. Comparative Genomic analyses of *Vibrio parahaemolyticus*: serotype conversion and virulence. *BMC Genomics*, 12:294 doi: 10.1186/1471-2164-12-294.
- Choudhari M.K., Puneekar S.A., Ranade R.V., Paknikar K.M. 2012. Antimicrobial activity of stingless bee (*Trigona* sp.) propolis used in the folk medicine of western Maharashtra, India. *Journal of Ethnopharmacology*, 141(1):363-7.
- Dantas A.P., Olivieri B.P., Gomes F.H., De Castro S.L. 2006. Treatment of *Trypanosoma cruzi*-injected mice with propolis promotes changes in the immune response. *Journal of Ethnopharmacology*, 103(2):187-93.
- De Barros M.P., Sousa J.P., Bastos J.K., de Andrade S.F. 2007. Effect on brazilian green propolis on experimental gastric ulcers in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 110(3):567-71.
- Domingo D., López-Brea M. 2003. Plantas con acción antimicrobiana. *Revista Española de Quimioterapia*, 16:385-393.
- Feng L., Suresh A., Yasuhiro T., Hiroyasu E., Shigetoshi K. 2010. Study on the constituents of Mexican propolis and their cytotoxic activity against PANC-1 human pancreatic cancer cells. *Journal of Natural Products*, 73:623-627.
- Grunberger D., Banerjee R., Eisinger K., Oltz E.M., Efros L., Caldwell L., Estevez V., Nakanishi K. 1988. Preferential cyto-toxicity on tumor-cells by caffeic acid phenethyl ester isolated from propolis. *Experientia*, 44:230-232.
- Hasan N.A., Grim C.J., Haley B.J., Chun J., Alam M., Taviani E., Hog M., Munk A.C., Saunders E., Brettin T.S., Bruce D.C., Challacombe J.F., Detter J.C., Han C.S., Xie G., Nair G.B., Hug A., Colwell R.R. 2010. Comparative

- genomics of clinical and environmental *Vibrio mimicus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 107(49):21134-9.
- Hernandez J., Goycoolea F.M., Quintero J., Acosta A., Castañeda M., Dominguez Z., Robles R., Vazquez-Moreno L., Velázquez E.F., Astiazaran H., Lugo E., Velázquez C. 2007. Sonoran propolis: chemical composition and antiproliferative activity on cancer cell lines. *Planta Medica*, 73:1469-1474.
- Igbiosa E.O., Okoh, A.I. 2010. *Vibrio fluvialis*: an unusual enteric pathogen of increasing public health concern. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 7(10):3628-43.
- Isla M.I., Zampini I.C., Ordoñez R.M., Cuello S., Juárez B.C., Sayago J.E., Nieva Moreno M.I., Alberto M.R., Vera N.R., Bedascarrasbure E., Alvarez A., Ciocchini F., Maldonado L.M. 2009. Effect of seasonal variations and collection form on antioxidant activity of propolis from San Juan, Argentina. *Journal of Medicinal Food*, 12(6):1334-1342.
- Jeong H-G., Satchell K.J.F. 2012. Additive Function of *Vibrio vulnificus* MARTX_{Vv} and V_{vhA} cytolytins promotes rapid growth and epithelial tissue necrosis during intestinal infection. *PLoS Pathogens*, 8(3):e1002581.
- Jorgensen J.H., Turnidge J.D., Washington J.A. 1999. Antibacterial susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods. Pp 1526-1543. In: Manual of Clinical Microbiology. P.R. Murray, E. Jo Baron, M.A. Pfaller, F.C. Tenover, R.H. Tenover (Ed). *American Society for Microbiology, Washington DC, USA*.
- Kim T.J., Taylor R.K. 2005. TcpF Is a Soluble Colonization Factor and Protective Antigen Secreted by El Tor and Classical O1 and O139 *Vibrio cholerae* Serogroups. *Infection and Immunity*, 73:4461-4470.
- Klose K.E. 2000. The suckling mouse model of cholera. Review. *Model Systems*, 8:189-191.
- Kujumgiev A., Tsvetkov I., Serkedjieva Y., Bankova V., Christov R. 1999. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *Journal of Ethnopharmacology*, 65:235-240.

- Lugo-Sepúlveda R.E. 2003. Constituyentes de los propóleos sonorenses y su actividad antiproliferativa contra líneas celulares transformadas, Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias en el CIAD, A.C.
- Mavri A., Abramovič H., Polak T., Bertoncej J., Jamnik P., Smole Možina S., Jeršek B. 2012. Chemical properties and antioxidant and antimicrobial activities of Slovenian propolis. *Chemistry and Biodiversity*, 9(8):1545-58.
- Murray P.R., Rosenthal K.S., Pfaller M.A. 2009. Microbiología Médica, Elsevier, Quinta Edición. Pp 339-342.
- Nakamura R., Nakamura R., Watanabe K., Oka K., Ohta S., Mishima S., Teshima R. 2010. Effects of propolis from different areas on mast cell degranulation and identification of the effective components in propolis. *International Immunopharmacology*, 10(9): 1107-12.
- Navarro N. 2007. Actividad Antibacteriana de Propóleos Sonorenses y de sus Principales Constituyentes. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias en el CIAD, A.C. pp 3.
- Navarro-Navarro M., Ruiz-Bustos P., Valencia D., Robles-Zepeda R., Ruiz-Bustos E., Virués C., Hernández J., Domínguez Z., Velázquez C. 2013. Antibacterial activity of Sonoran propolis and some of its constituents against clinically significant *Vibrio* species. *Foodborne Pathogens and Disease; Foodborne Pathogens and Disease*, 10(2):150-158.
- Oliver J.D. 2005. Wound infections caused by *Vibrio vulnificus* and other marine bacteria. *Epidemiology and Infection*, 133(3):383-91.
- Olivier V., Salzman N.H., Satchell K.J. 2007. Prolonged Colonization of Mice by *Vibrio cholerae* El Tor O1 Depends on Accessory Toxins. *Infection and Immunity*, 75(10):5043-5051.
- Pagliarone A.C., Missima F., Orsatti C.L., Bachiega T.F., Sforcin J.M. 2009. Propolis effect on Th1/Th2 cytokines production by acutely stressed mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 125(2):230-3.

- Park Y.K., Alencar S.M., Aguiar C.L. 2002. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50:2502-2506.
- Pepeljnjak S., Kosalec, I. 2004. Galangin expresses bacterial activity against multiple-resistant bacteria: MRSA, *Enterococcus* sp. and *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiology Letters*, 240:111-116.
- Popova M., Bankova V., Chimov A., Silva M. 2002. A scientific note on the high toxicity of propolis that comes from *Myroxylon balsamum* trees. *Apidologie*, 33:87-88.
- Popova M., Chen C.N., Chen P.Y., Huang C.Y., BANKOVA V. 2010. A validated spectrophotometric method for quantification of prenylated flavanones in pacific propolis from Taiwan. *Phytochemical analysis*, 21:186-191.
- Sack D.A., Lyke C., McLaughlin C., Suwanvanichkij V. 2001. Antimicrobial resistance in shigellosis, cholera and campylobacteriosis. World Health Organization Editorial, 51 Pp.
- Salomao K., Dantas A.P., Borboa C.M., Campos L.C., Machado D.G., Aquino-Neto F.R., de Castro S.L. 2004. Chemical composition and microbicidal activity of extracts from Brazilian and Bulgarian propolis. *Letters of Applied Microbiology*, 38:87-92.
- Sforcin J.M., Fernandes Jr A., Lopes C.A.M., Bankova V., Funari S.R.C. 2000. Seasonal effect of Brazilian propolis antibacterial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 73:243-249.
- Silva J.C., Rodrigues S., Feás X., Estevinho L.M. 2012. Antimicrobial activity, phenolic profile and role in the inflammation of propolis. *Food Chemistry and Toxicology*, 50(5):1790-5.
- Simoes-Ambrosio L.M.C., Gregório L.E., Sousa J.P.B., Figueiredo-Rinhel A.S.G., Azzolini A.E.C.S., Bastos J.K., Lucisano-Valim Y.M. 2010. The role of seasonality on the inhibitory effect of Brazilian green propolis on the oxidative metabolism of neutrophils. *Fitoterapia*, 81:1102-1108.

- Takaisi-Kikuni N.B., Schilcher H. 1994. Electron microscopic and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance. *Planta Medica*, 60(3):222-7
- Teixeira E.W., Message D., Negri G., Salatino A., Stringheta P.C. 2010. Seasonal variation, chemical composition and antioxidant activity of Brazilian propolis samples. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*, 7(3):307-15.
- Thompson F.L., Austin B., Swings J. 2006. The biology of *Vibrios*. Washington, DC: *American Society of Microbiology*.
- Uzel A., Sorkun K., Öncag Ö., Cogulu D., Gencay Ö., Sali B. 2005. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. *Microbiology Research*, 189-195.
- Valencia D. 2012. Evaluación de propóleos de Ures, Sonora, como material bioactivo/efecto de la temporalización sobre su composición química y sus actividades biológicas. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencia de Materiales. Departamento de Investigación en Polímeros y Materiales de la Universidad de Sonora.
- Valencia D., Alday E., Robles-Zepeda R., Garibay-Escobar A., Galvez-Ruiz J.C., Salas-Reyes M., Jiménez-Estrada M., Velázquez-Contreras E., Hernandez J., Velázquez C. 2012. Seasonal effect on chemical composition and biological activities of Sonoran propolis. *Food Chemistry*, 131:645-651.
- Velázquez C., Navarro M., Acosta A., Angulo A., Dominguez Z., Robles R., Robles-Zepeda R., Lugo E., Goycoolea F.M., Velázquez E.F., Astiazaran H., Hernandez J. 2007. Antibacterial and free-radical scavenging activities of Sonoran propolis. *Journal of Applied Microbiology*, 103, 1747-1756.
- Vera N., Solorzano E., Ordoñez R., Maldonado L., Bedascarrasbure E., Isla M.I. 2011. Chemical composition of Argentinean propolis collected in extreme

- regions of and its relation with antimicrobial and antioxidant activities. *Natural Products Communication*, 6(6): 823-7.
- West P.A., 1989. The human pathogenic vibrios – A public health update with environmental perspectives. *Epidemiology and Infection*, 103: 1-24.
- WHO., 2001. WHO Global Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance. http://www.who.int/csr/resources/publications/drugresist/en/EGlobal_Strat.pdf. Fecha de consulta: Enero de 2012.
- WHO., 2012a. The 10 leading causes of death in the world, 2000 and 2008. www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/. Fecha de consulta: Noviembre de 2012.
- WHO., 2012b. Cólera. www.who.int/topics/cholera/about/es/index.html. Fecha de consulta: Noviembre de 2012.
- Yousef M.I., Salama A.F. 2009. Propolis protection from reproductive toxicity caused by aluminium chloride in male rats. *Food and Chemical Toxicology*, 47(6): 1168-75.

APÉNDICES

Apéndice I. Elaboración del inóculo bacteriano para las determinaciones antimicrobianas *in vitro*, mediante el método de microdilución en caldo.

Metodología:

1. Se partió de un cultivo de 24 horas en un agar selectivo (TCBS, MacConkey).
Nota: si la muestra proviene de un medio de congelación, se recomienda que primero se realice una siembra de 24 horas en un medio líquido (Müller-Hinton o Caldo Trypticase Soya con 2% de NaCl, si se utilizarán distintas especies de *Vibrio*) para aumentar el número de bacterias.
2. Se seleccionaron las colonias aisladas y con las características particulares de la cepa a estudiar del medio selectivo (TCBS, MacConkey) y se preparó un cultivo bacteriano de 12 a 14 horas en agar no selectivo (Müller-Hinton o Trypticase Soya Trypticase con 2% de NaCl).
3. Enseguida, se volvieron a seleccionar colonias aisladas del medio sólido anteriormente mencionado, para depositarlas a un tubo con solución salina estéril y después leer su densidad óptica a 620 nm en el lector de microplacas BioRad-Benchmark.
4. Se repitió el paso número 3 hasta lograr obtener una lectura de densidad óptica entre 0.09 a 0.1, que equivale a 10^8 UFC/mL.

Apéndice II. Protocolo del método de microdilución en caldo.

Materiales:

Matraz volumétrico de 250 mL.

Probetas de 100 y 1000 mL.

Balanza analítica.

Placas petri de vidrio esterilizadas (5).

Placas petri de plástico para cultivos bacterianos.

Mechero de alcohol.

Encendedor.

Papel estroza.

Autoclave.

Tubos Falcon de 50 mL (15).

Puntas amarillas estériles.

Puntas azules estériles.

Placas de 3 o 12 pozos de fondo plano (2).

Placas de 96 pozos de fondo plano (1)

Micropipetas de 20-200 y 1000 μ L.

Micropipeta multicanal que tenga la capacidad de tomar desde 15 μ L hasta 200 μ L.

Asa.

Soluciones:

Caldo Trypticosa Soya (Bacto™ Tryptic Soy Broth de BD).

30 g del medio se disuelven en 1000 mL de agua destilada. Calentar un poco la mezcla hasta que se disuelva, enseguida depositar el caldo en los tubos de 40 ml y se esteriliza.

Solo se ocuparon 400 mL, por lo que:

30 g. de caldo ----- 1000 mL agua destilada

X ----- 400 mL de agua destilada X= 12 g de caldo + 8 g.
de NaCl

SI SE VA A TRABAJAR ÚNICAMENTE CON Vibrio cholerae, NO ES NECESARIO QUE SE AÑADA NaCl. EN EL CASO QUE TAMBIÉN SE VAYA A TRABAJAJAR CON OTRAS ESPECIES DE Vibrio, ENTONCES SÍ SE UTILIZA EL NaCl, CON EL FIN DE HOMOGENIZAR PROCEDIMIENTO A REALIZAR FRENTE A TODOS LOS Vibrios.

Placas con Agar TCBS

89 g. del medio se disuelven en 1000 mL de agua destilada. Calentar hasta ebullición y hervir por 1 a 2 minutos; no esterilizar y distribuir en cajas petri de plástico.

Solo se ocuparon 200 mL, por lo que:

89 g de TCBS ----- 1000 mL agua destilada

X ----- 200 mL agua destilada X= 17.8 g de TCBS

DMSO

Estéril y listo para su uso.

Solución Salina

8.5 g de NaCl se disuelven en 1000 mL de agua deionizada, se colocan de 5-8 mL en tubos de vidrio de boca ancha con tapón. Aparte se vierten 40 mL en un tubo Falcon de 50 mL. Todo se esteriliza y estará listo para su uso.

Gentamicina

Lista para su uso. La concentración final de gentamicina a utilizar durante el experimento (en los pozos de prueba) es de 12.0-20.0 µg/mL.

Muestras de propóleos de Ures

Se conservan en la obscuridad a 37°C.

Metodología:

1. Preparar un cultivo de 12-14 horas de *Vibrio cholerae*.
2. En la campana, hacer las diluciones de los propóleos a estudiar en placas de 12 o 6 pozos de acuerdo al esquema 1. Enseguida, depositar por triplicado 200 μL de cada una de las concentraciones finales de los propóleos en estudio. Dejar la microplaca en resguardo dentro de la campana hasta poder continuar con el trabajo.
3. Elaborar el inóculo bacteriano en solución salina estéril hasta una D.O. entre 0.09 a 0.1 a 620 nm.
4. Depositar en los pozos de prueba y en los controles respectivos, 15 μL del inóculo bacteriano previamente estandarizado.
5. Realizar la lectura correspondiente al tiempo cero ($T=0$) en un lector de microplacas a 620 nm.
6. Incubar la placa y tomar las lecturas correspondientes a las 6, 12, 24 y 48 horas de incubación.
7. Utilizando el Software Prism, elaborar las gráficas correspondientes al desarrollo y/o inhibición del crecimiento bacteriano utilizando las lecturas durante las 48 horas.

Apéndice III. Tabla 5. Concentración mínima inhibitoria (MIC₅₀), (MIC₉₀) de los propóleos de Ures recolectados en las cuatro diferentes épocas del período 2008-2009, frente a *S. aureus* ATCC 6538P y *E. coli* ATCC 25922.

Cepa	Estación	MIC₅₀ (µg/mL)	MIC₉₀ (µg/mL)
<i>S. aureus</i> ATCC 6538P	Primavera	100	200
	Verano	50	100
	Otoño	50	50
	Invierno	50	100
<i>E. coli</i> ATCC 25922	Primavera	200	>400
	Verano	400	400
	Otoño	400	>400
	Invierno	400	>400

Apéndice IV. Tabla 6. Concentración mínima inhibitoria (MIC₅₀), (MIC₉₀) de los propóleos de Ures recolectados en las cuatro diferentes épocas del período 2008-2009, frente a diferentes especies del género *Vibrio*.

Cepa	Estación	MIC₅₀ (µg/mL)	MIC₉₀ (µg/mL)
<i>V. mimicus</i> ATCC 33653	Primavera	50	200
	Verano	50	100
	Otoño	50	100
	Invierno	50	200
<i>V. cholerae</i> no O1	Primavera	50	200
	Verano	50	200
	Otoño	50	200
	Invierno	50	200
<i>V. cholerae</i> O1 Inaba	Primavera	50	100
	Verano	50	200
	Otoño	100	200
	Invierno	50	200
<i>V. cholerae</i> O1 Ogawa	Primavera	100	400
	Verano	100	400
	Otoño	100	400
	Invierno	100	400
<i>V. parahaemolyticus</i> ATCC 17802	Primavera	200	200
	Verano	200	200
	Otoño	200	200
	Invierno	400	400
<i>V. alginolyticus</i>	Primavera	400	400
	Verano	400	400
	Otoño	200	400
	Invierno	200	200
<i>V. fluvialis</i>	Primavera	400	>400
	Verano	400	400
	Otoño	400	>400
	Invierno	400	>400