

GARCIA, MARIANA CELE
Accion antibacterian

2011

71188

71188

MFN:
Clasif:
T-750

71188



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO

Tesis Doctoral

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**“ACCIÓN ANTIBACTERIANA Y
COMPONENTES ACTIVOS EN
JALEA REAL REGIONAL”**

Mariana Celeste García

- Diciembre de 2011 -

1. $\frac{1}{x^2} = x^{-2}$

2. $\frac{1}{x^3} = x^{-3}$

3. $\frac{1}{x^4} = x^{-4}$

4. $\frac{1}{x^5} = x^{-5}$

5. $\frac{1}{x^6} = x^{-6}$

6. $\frac{1}{x^7} = x^{-7}$

7. $\frac{1}{x^8} = x^{-8}$

8. $\frac{1}{x^9} = x^{-9}$

9. $\frac{1}{x^{10}} = x^{-10}$

10. $\frac{1}{x^{11}} = x^{-11}$

11. $\frac{1}{x^{12}} = x^{-12}$

12. $\frac{1}{x^{13}} = x^{-13}$

13. $\frac{1}{x^{14}} = x^{-14}$

14. $\frac{1}{x^{15}} = x^{-15}$

15. $\frac{1}{x^{16}} = x^{-16}$

16. $\frac{1}{x^{17}} = x^{-17}$

17. $\frac{1}{x^{18}} = x^{-18}$

18. $\frac{1}{x^{19}} = x^{-19}$

19. $\frac{1}{x^{20}} = x^{-20}$

20. $\frac{1}{x^{21}} = x^{-21}$

21. $\frac{1}{x^{22}} = x^{-22}$

22. $\frac{1}{x^{23}} = x^{-23}$

23. $\frac{1}{x^{24}} = x^{-24}$



Universidad Nacional de Río Cuarto

Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales

Departamento de Microbiología e Inmunología

Departamento de Química

Director:

.....
Dr. Juan Miguel Mariotti

Codirectora:

.....
Dra. Monica Silvia Finola

Integrantes del Jurado de Tesis:

.....
Dra. Miriam Etcheverry

.....
Dr. Horacio Terzolo

.....
Dra. Alicia Zón

*"Si la abeja desapareciera de la superficie del globo,
al hombre sólo le quedarían cuatro años de vida: sin abejas, no
hay polinización, ni hierba, ni animales, ni hombres"*

Albert Einstein

*A Lucas y Claudio,
la razón de mi existir*

Hubo un momento en que, mientras realizaba esta Tesis, mi vida cambió totalmente. En medio de tanto trabajo, cuando todo se tornaba cada vez más difícil e inalcanzable, un milagro ocurrió en mi vida: la llegada de Lucas, mi hijo. A él tengo que agradecer por siempre el haberme enseñado que la simpleza de su mirada y su dulce sonrisa son mis bienes más preciados. Gracias a vos hijito, recobré fuerzas y me levanté cada vez que tropecé para poder continuar y lograr la meta propuesta. Fuiste y serás por siempre mi fuente de inspiración. Gracias por llegar a mi vida y perdón por mis ausencias.

♣ a Dios agradezco, por sobre todo, el haberme dado la vida y cruzar mi camino con el de tantas personas especiales cuyo cariño y apoyo incondicional hicieron posible el desarrollo de esta Tesis; por eso quiero agradecer infinitamente:

♣ a Juan, mi director, por sumarme a su grupo de trabajo, por guiarme cuando fue necesario, por sus consejos, su paciencia y por enseñarme a profundizar y a amar el maravilloso mundo de la Química.

♣ a Mónica, mi codirectora, por depositar su confianza en mí, por apoyarme, aconsejarme y cuidarme. Sus invaluable correcciones y sugerencias me resultaron iluminadoras y su gran fortaleza, un ejemplo de vida. Siempre me dijo: *sin prisa pero sin pausa...* este sabio consejo que me dio para la vida me ayudó a alcanzar mi objetivo.

♣ a los miembros de la Comisión de Tesis: Alicia, Miriam y Horacio, por su dedicación en la lectura exhaustiva de mi tesis, las invaluable correcciones y sugerencias y por convertirse en una guía central a lo largo de este complejo proceso de investigación.

♣ a Claudio, por ser mi compañero de vida, a quien elegí y volvería a elegir una y mil veces más. Gracias por el amor, la comprensión, la tolerancia y la inmensa paciencia en esos momentos en que todo parecía derrumbarse y no tener solución. Gracias por lo más maravilloso: ser el papá de Lucas, fruto de tanto amor.

♣ a Gladys, mi mamá. Tu calma en mis grandes tormentas me dio fortaleza, tus palabras dichas a tiempo, con tanto cuidado y respeto me permiten ver el otro lado de las cosas. Gracias por ser quien cuida a mi tesoro más preciado, a cualquier hora del día o de la noche. Sin tu ayuda hubiera sido imposible lograr este objetivo. Gracias mami por compartir conmigo la vida.

♣ a Raúl, mi papá, por su apoyo moral, por su amor, sus consejos que ayudaron a no claudicar y a continuar mi camino. Gracias por ser el abuelo malcriador y divertido que Lucas adora. Gracias papí, por estar en cada etapa de mi vida.

♣ a mi hermano Dante y a Noe, por estar siempre presentes en mi vida y en mi corazón a pesar de la distancia. Gracias por esa personita tan bella, mi sobrina y ahijada, Josefina: gracias por toda tu dulzura y por existir.

♣ a mis abuelos, Tita y Alberto, símbolos de mi infancia, que despiertan en mí los mejores recuerdos, gracias por todo su cariño, su ayuda incondicional, y por ser ¡¡los mejores abuelos del Universo!!

♣ a Pochi, Vivi, Ari y Javi, por su cariño, por alegrarse con mis logros, y por estar presentes en cada etapa de mi vida.

♣ a Juli, una persona fundamental en esta historia. Por tantos momentos lindos y a veces no tanto, por los mates y las largas charlas compartidas. Por esa sonrisa con que me recibía cada día. Juli: gracias por brindarme tu casa, con tanto cariño, en cualquier momento y por adaptarte a mis tiempos. Sabés muy bien que sin vos hoy no estaría acá. ¡¡Infinitas gracias, hermanita académica!!

♣ a Gabi, quien me ayudó siempre en el laboratorio, cuando parecía enredarme entre agarraderas y soportes. Gracias por contagiarme tanta paz, por tu simplicidad y tus consejos. Gracias amiga, por los hermosos momentos compartidos y por hacer que mi trabajo junto a vos fuera mucho más simple.

♣ a Vero, por aquellos primeros tiempos compartidos en el laboratorio que forjaron nuestra duradera y hermosa amistad. Gracias amiga, por estar en cada momento de mi vida, por alentarme a seguir, siempre con ese optimismo y dulzura que tanto te caracterizan.

♣ A Vale, quien confió en mí eligiéndome para realizar su Tesina. Fue muy lindo trabajar juntas y lo más importante: nació una hermosa amistad entre nosotras.

♣ a Pauli, porque tu amistad es una de las cosas más lindas que me pasó gracias a la realización de Tesis, sos una personita muy especial, gracias por tu simpleza.

♣ a Diego, por tantos momentos de alegría compartidos, a veces con risas y otras con lágrimas, por toda tu ayuda con la Química, por escucharme y por tus consejos. Nunca voy a olvidar cómo me creía cada cosa que me decías, y siempre eran bromas, y cómo nos divertíamos. Gracias por todo amigo.

♣ a Juli V, mi amiga del alma, gracias por compartir tantos momentos de la vida y por entenderme tanto y a veces tan sólo con la mirada, gracias por estar siempre y calmar mis ansiedades y tristezas con las palabras justas. Fuiste un gran sostén durante todos estos años y sabés que sos imprescindible en mi vida. Gracias por colaborar con tus correcciones.

♣ a Vani, mi querida amiga desde la infancia, tengo los mejores recuerdos juntas, gracias por caminar a mi lado en la vida y por brindarme tu hermosa amistad, gracias por tus consejos, comprensión y compañía en esos momentos en que todo se veía gris. Y gracias por tu ayuda en la impresión de la Tesis.

♣ a mis amigas de tantos años, Dani y Lore, con las que comencé este camino, gracias por sus consejos y por estar cada vez que necesité de ustedes.

♣ a Vani R, amiga querida, gracias por tu hermosa amistad, por ser una persona que contagia tanta alegría y tranquilidad. Gracias por estar presente en mi vida desde hace tantos años.

♣ a Shana, porque tu amistad es tan importante en mi vida, porque estas en mi corazón a pesar de la distancia y porque sé que es recíproco. Gracias amiga, por tan lindos momentos compartidos. ¡¡Siempre estaré esperando tu visita!!

♣ a mis nuevos amiguitos, hijitos del corazón: Emi, Valen, Sofi, Emilia, Jose, Fran, Nacho y Seba; a mis sobrinos, Jose, Enzo, Valentín, Victoria, Flor, Agos y Vicky, a todos, gracias por alegrar mi vida. ¡¡Los quiero tanto!!!

♣ a Clau y a Estefi, mis aliadas en la investigación de la jalea real, porque ustedes saben lo que eso significa. Gracias por estar tan presentes cuando más lo necesitaba, por haberme elegido, por comprenderme, ayudarme y tenerme paciencia. Me llena de orgullo haberlas visto lograr sus objetivos.

♣ a Majo, gracias por elegirme, porque así nació esta hermosa amistad, por hacerme reír tanto y alegrar todos mis días en el laboratorio. Me encantó conocerte y haber colaborado con tu formación profesional.

♣ a Denise, Juli, Aye, Andre y Adri por su agradable compañía en el laboratorio, por dejarme ser partícipe de sus trabajos y sus logros. Fue muy lindo conocerlas.

♣ a Susi, Ceci, Dani y Lauri, mi gente tan querida de alimentos. Nunca voy a dejar de agradecerles por brindarme un lugar, por tenerme en cuenta y por enseñarme que la humildad y la familia están por sobre todas las cosas. ¡¡Adoro trabajar con ustedes!! A Nati, Tania y Luisina, gracias por su ayuda y por estar en este último tramo del camino.

♣ a Nico, Mechi, Mirta, Evange y Cari por estar presentes en cada paso que doy. Por sus consejos, compañía, mates y tantos momentos tan especiales compartidos. Por hacerme sentir como si fuera una más en su grupo de trabajo.

♣ a Ceci, Vivi, Claudia, Mirta, Lili y Elina, porque cada una de ustedes fue muy importante en la realización de mi Tesis, porque sus palabras y su comprensión llegaron en el momento que más lo necesitaba.

♣ a Rosendo, Guillermina, Ivana, Valeria y Cintia, gracias por estar siempre, por comprender mis contratiempos y por el trabajo compartido. Me encantó conocerlos.

♣ a Martín, por sus consejos para comenzar con la redacción del manuscrito, por ser una persona fundamental al final de este camino. Gracias por ayudarme a lograrlo.

♣ a Silvana, y a Shana por cederme las cepas de mastitis; a Euge y a Oscar por ayudarme con la liofilización de la jalea real.

♣ a San Expedito, por escucharme e interceder por mí ante Dios.

Debido a que el uso de los antibióticos se ha extendido desde hace más de cincuenta años, las bacterias han ido desarrollado una resistencia progresiva ocasionando un importante problema de salud en todo el mundo, siendo una amenaza cada vez mayor tanto en los seres humanos como en los animales. En consecuencia, continuamente se realizan esfuerzos científicos para estudiar y desarrollar nuevos compuestos con acción antimicrobiana, distintos de la terapia antibiótica convencional y que no sean contaminantes. Así, la jalea real (JR) o sus componentes activos, podrían ser utilizados como una terapia antibiótica alternativa. La JR es una secreción nutritiva de consistencia cremosa, blanco-amarillenta, ácida, con olor y sabor ligeramente picantes producida por el sistema de glándulas cefálicas (hipofaríngeas y mandibulares) de abejas obreras (*Apis mellifera* L.). Está compuesta por agua, proteínas de alto valor biológico, carbohidratos, lípidos como el ácido graso específico trans 10-hidroxi-2-decenoico (10-HDA), minerales, aminoácidos libres y vitaminas.

Dado que, hasta el momento, no existen investigaciones de actividad antibacteriana de JR y de sus extractos etéreos (EE) y extractos desgrasados (ED) sobre bacterias causantes de infecciones superficiales en seres humanos y de mastitis en bovinos, se propone realizar dichos estudios con la finalidad de ampliar el espectro de bioactividad de tan importante producto de la colmena.

Se obtuvieron muestras de JR de diferentes regiones ecológicas de Argentina denominadas Regional (JR R), Norte Grande (JR NG), Corrilobo (JR C) y La Pampa (JR LP) las que fueron analizadas mediante ensayos fisicoquímicos determinando su pureza; los EE y ED se obtuvieron a partir de las muestras de JR liofilizadas utilizando un extractor Soxhlet. La bioactividad se evaluó determinando Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) por las técnicas de dilución en tubo, difusión en pozo y microdilución en caldo sobre cepas bacterianas de *Enterococcus*, aisladas de infecciones superficiales en seres humanos, de *Staphylococcus* y *Streptococcus*, aisladas de mastitis en bovinos y sobre bacterias Gram negativo, aisladas de ambas infecciones. El género *Staphylococcus* resultó más sensible a las muestras de JR con respecto a los otros grupos bacterianos estudiados. Las muestras de JR demostraron variabilidad en cuanto a su actividad antibacteriana siendo JR C y JR NG las más activas y JR LP y JR R las menos activas. Los EE ejercieron mayor actividad antibacteriana que sus correspondientes ED. La separación mediante cromatografía en capa delgada de los componentes de los EE de la JR NG y de la JR C mostró la presencia de 4 bandas con diferentes R_f . En ambos casos, los componentes de mayor polaridad evidenciaron actividad antibacteriana cuando se las estudió mediante la técnica de bioautografía. Finalmente, la fracción lipídica activa (FLA) del EE de la JR C se obtuvo por cromatografía en columna que, al estudiarse por cromatografía gaseosa, demostró un espectro limpio con un único componente cuyo tiempo de retención coincidió con el del patrón 10-HDA. La bioactividad de la FLA y del 10-HDA se evaluó individualmente determinando CIM por técnica de microdilución en caldo sobre bacterias Gram positivo y negativo, siendo las primeras sensibles a ambos y resistentes las segundas.

Estos resultados constituyen la primera evidencia del uso de jalea real y su extracto lipídico como agentes antibacterianos frente a bacterias causantes de infecciones superficiales en seres humanos y de mastitis en bovinos e indican la elevada sensibilidad que presentan dichas bacterias frente a productos naturales. Es así como se propone la utilización de jalea real y/o de su extracto lipídico como tratamiento alternativo y natural de infecciones superficiales en seres humanos y de mastitis en bovinos.

Because the extended use of antibiotics for over fifty years, bacteria have developed a progressive resistance causing a major health problem worldwide, with a growing threat in both humans and animals. Consequently, scientists are continually making efforts to study and develop new compounds with antimicrobial action, non contaminating and out of conventional antibiotic therapy. Thus, royal jelly (RJ) or its active components could be used as an alternative antibiotic therapy. The RJ is a creamy nutritious secretion, yellowish-white, acid with slightly pungent odor and flavor produced by the cephalic glands system (hypopharyngeal and mandibular) of worker bees (*Apis mellifera* L.). It is composed of water, high biological value proteins, carbohydrates, lipids such as the specific fatty acid, trans 10-hydroxy-2-decenoic (10-HDA), minerals, amino acids and vitamins. So far, no research on antibacterial activity of RJ and its ethereal (EE) and defatted extracts (DE) on bacteria causing superficial infections in humans and bovine mastitis could be found in the literature. Thus, the aim of this work was to study the antibacterial activity of such an important product of the hive in order to broaden the spectrum of bioactivity.

The JR samples were obtained from different ecological regions in Argentina called Regional (RJ R), Norte Grande (RJ NG), Corrilobo (RJ C) and La Pampa (RJ LP) which were analyzed by physicochemical tests determining its purity; the EE and DE were obtained from freeze-dried samples using a Soxhlet extractor. The bioactivity was evaluated by determining Minimum Inhibitory Concentration (MIC) by tube dilution methods, agar diffusion methods and broth microdilution methods on bacterial strains of *Enterococcus* isolated from superficial infections in humans, *Streptococcus* and *Staphylococcus* isolated from bovine mastitis and Gram negative bacteria isolated from both infections. The genus *Staphylococcus* was more sensitive to RJ samples with respect to the other groups of bacteria (*Enterococcus sp.*, *Streptococcus sp.* and Gram negative bacteria). The RJ samples showed variability in its antibacterial activity being RJ C and RJ NG more active than the samples RJ R and RJ LP. The EE exerted greater antibacterial activity than the ED. Separation of the components of the EE of RJ NG and the EE of the RJ C by thin layer chromatography showed the presence of 4 bands with different R_f . Bioautography analysis showed that the components with higher polarity showed antibacterial activity. Finally, the active lipidic fraction (ALF) of EE of RJ C was obtained by column chromatography. The ALF was analyzed by gas chromatography showing a clean spectrum that revealed a single component whose retention time coincided with that of 10-HDA. The bioactivity of the ALF and the 10-HDA was assessed individually determining the MIC by broth microdilution methods on Gram positive and Gram negative bacteria. The Gram positive bacteria were sensitive to the ALF and the 10-HDA and the Gram negative bacteria were resistant to both compounds.

These results provide the first evidence of the use of royal jelly and its lipid extract as antibacterial agents against bacteria causing superficial infections in humans and bovine mastitis and indicate the high sensitivity showed by these bacteria to natural products. Thus, we propose the use of royal jelly and / or its lipid extract as natural alternative treatment of superficial infections in human and bovine mastitis.

INTRODUCCIÓN

1. Resistencia a antimicrobianos	31
2. Sustancias naturales con actividad antimicrobiana	33
3. Las abejas	34
3.1. Clasificación taxonómica	35
3.2. Las razas apícolas más importantes	35
3.3. La colmena	36
3.4. La abeja reina	38
3.5. Productos elaborados por las abejas	39
4. La jalea real	41
4.1. Composición	42
4.2. Definición de jalea real según el Código Alimentario Argentino	43
4.3. Forma de producción	44
4.4. Propiedades farmacológicas de la jalea real	44
4.5. Usos de la jalea real	45
4.6. Actividad antimicrobiana de jalea real	47
4.6.1. Proteínas y péptidos de jalea real con actividad antimicrobiana	48
4.6.2. Ácidos grasos de jalea real con actividad antimicrobiana	49
4.6.2.1. El ácido 10-hidroxi-2-decenoico como parámetro de autenticidad de jalea real	51
5. La apicultura en Argentina	52
6. La apiterapia	53
7. Infecciones bacterianas superficiales de piel y de tejidos blandos	53
8. Mastitis bovina	57
8.1. Patogénesis	58
8.2. Clasificación	59
8.2.1. Mastitis clínica	59
8.2.2 Mastitis subclínica	60
8.3. Patógenos de mastitis bovina	61
8.3.1. Patógenos contagiosos	61
8.3.2. Patógenos ambientales.....	62
8.3.3. Patógenos oportunistas	63

8.4. Tratamiento	63
9. <i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina	64
10. Técnicas para evaluar la actividad antibacteriana de productos naturales	65
10.1. Técnicas de difusión en agar en discos de papel y en pozo	67
10.2. Técnicas de dilución en caldo y en agar	68
10.3. Técnica de bioautografía	69
11. Obtención de extractos lipídicos y desgrasados (proteicos) a partir de productos naturales	72
HIPÓTESIS	79
OBJETIVOS	83
1. Objetivo General	83
2. Objetivos Específicos	83
MATERIALES Y MÉTODOS	
1. Muestras de jalea real	87
2. Caracterización fisicoquímica de las muestras de jalea real	87
2.1. Determinación de humedad	88
2.2. Determinación de pH	88
2.3. Determinación del índice de acidez	88
2.4. Determinación de proteínas totales	88
2.5. Determinación de lípidos totales.....	89
2.6. Determinación de cenizas	89
2.7. Análisis de carbohidratos	90
3. Preparación de diluciones de jalea real utilizadas en los ensayos de actividad antibacteriana	90
4. Obtención de extractos lipídicos y extractos desgrasados de jalea real	91
4.1. Liofilización de muestras de jalea real	91
4.2. Técnica de extracción continua de lípidos utilizando un extractor Soxhlet	91
5. Cepas bacterianas	92

5.1. Conservación y propagación de cepas bacterianas	95
5.2. Preparación del inóculo bacteriano utilizado en los ensayos de actividad antibacteriana	96
6. Ensayos de evaluación de la actividad antibacteriana de la jalea real	97
6.1. Técnica de difusión en disco	97
6.2. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) y de la concentración bactericida mínima (CBM) de jalea real por la técnica de dilución en tubo	98
6.3. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de jalea real por la técnica de difusión en pozo	99
6.3.1. Análisis estadístico	100
6.4. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de jalea real por la técnica de microdilución en caldo	100
7. Ensayos de actividad antibacteriana de extractos etéreos (EE) y extractos desgrasados (ED) de jalea real por la técnica de difusión en pozo	101
8. Ensayo de la actividad antibacteriana de extractos lipídicos de jalea real por la técnica de bioautografía indirecta	102
8.1. Separación de compuestos de los extractos etéreo (EE) y hexánico (EH) de jalea real por cromatografía en capa delgada (CCD).....	102
8.2. Técnica de bioautografía indirecta	103
9. Ensayos de actividad antibacteriana de la fracción lipídica activa (FLA) del extracto etéreo de JR C por la técnica de microdilución en caldo	104
9.1. Obtención de la fracción lipídica activa mediante cromatografía en columna de sílica	104
9.2. Determinación de la concentración inhibitoria mínima de la fracción lipídica activa (FLA) del EE de JR C y del ácido 10-hidroxi-2-decenoico (10-HDA) patrón por la técnica de microdilución en caldo	106
10. Estudio de la composición química de la fracción lipídica activa del EE de JR C	107
10.1. Derivatización de la fracción lipídica activa (FLA) y del ácido 10-hidroxi-2-decenoico (10-HDA).....	107

10.2. Cromatografía gaseosa con detector de ionización de llamas (GC-FID)	107
---	-----

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Caracterización fisicoquímica de las muestras de jalea real	111
2. Análisis de carbohidratos de las muestras de jalea real por HPLC	114
3. Obtención de extractos lipídicos y extractos desgrasados de jalea real	117
4. Preparación del inóculo bacteriano estandarizado utilizado en los ensayos de actividad antibacteriana	118
5. Ensayos de evaluación de la actividad antibacteriana de la jalea real	120
5.1. Técnica de difusión en disco	120
5.2. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) y de la concentración bactericida mínima (CBM) de jalea real por la técnica de dilución en tubo	120
5.3. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de jalea real por la técnica de difusión en pozo	127
5.3.1. Análisis estadístico	145
5.4. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de jalea real por la técnica de microdilución en caldo	148
6. Ensayos de actividad antibacteriana de extractos etéreos (EE) y extractos desgrasados (ED) de jalea real por la técnica de difusión en pozo	
7. Ensayo de la actividad antibacteriana de extractos lipídicos de jalea real por la técnica de bioautografía indirecta	158
7.1. Separación de compuestos de los extractos etéreo (EE) y hexánico (EH) de jalea real por cromatografía en capa delgada	158
7.2. Técnica de bioautografía indirecta	162
8. Ensayos de actividad antibacteriana de la fracción lipídica activa (FLA) del extracto etéreo (EE) de JR C por técnica de microdilución en caldo	170
8.1. Separación y obtención de los compuestos del extracto etéreo (EE) de JR C ...	170
8.2. Determinación de la concentración inhibitoria mínima de la fracción lipídica activa (FLA) de JR C y del ácido 10-hidroxi-2-decenoico (10-HDA) patrón por la técnica de microdilución en caldo	171
9. Estudio de la composición química de la fracción lipídica activa	

del EE de JR C	174
9.1. Cromatografía gaseosa con detector de ionización de llamas (GC-FID).....	174
CONCLUSIONES	179
ANEXO I	185
BIBLIOGRAFÍA	191

Figura 1: Las diferentes castas de la colmena de abejas.....	37
Figura 2: Larvas de abejas reinas creciendo en jalea real	38
Figura 3: Jalea real virgen	42
Figura 4: Productos cosméticos con jalea real	47
Figura 5: Coloración de Gram de algunas cepas bacterianas asociadas a infecciones intramamarias	63
Figura 6: Extracción de lípidos utilizando extractor Soxhlet	92
Figura 7: Cromatograma correspondiente a la mezcla de patrones: glucosa, fructosa y sacarosa ($1,0 \times 10^{-4}$ M)	114
Figura 8: Cromatograma correspondiente a la inyección de JR R.	115
Figura 9: Cromatograma correspondiente a la inyección de JR NG.	116
Figura 10: CBM de JR NG sobre <i>P. aeruginosa</i> 2	123
Figura 11: CIM de JR R y JR NG obtenida por la técnica de dilución en tubo	125
Figura 12: CBM de JR R y JR NG obtenida por la técnica de dilución en tubo	126
Figura 13: CBM de JR R sobre <i>S. aureus</i> MS 1	127
Figura 14: Actividad antibacteriana de JR NG por la técnica de difusión en pozo sobre <i>S. aureus</i> MS 1	134
Figura 15: Actividad antibacteriana de JR NG por la técnica de difusión en pozo sobre <i>S. aureus</i> MR 2	134
Figura 16: Actividad antibacteriana de JR C por la técnica de difusión en pozo sobre <i>S. agalactiae</i> D	139
Figura 17: Actividad antibacteriana de JR LP por la técnica de difusión en pozo sobre <i>S. aureus</i> MR 2	144
Figura 18: CIM promedio de las cuatro muestras para cada grupo bacteriano e intervalo de confianza de Tukey	146
Figura 19: CIM promedio de los cuatro grupos bacterianos para cada muestra e intervalo de confianza de Tukey	147
Figura 20: Actividad antibacteriana de JR C sobre <i>S. aureus</i> MS 1 y <i>S. aureus</i> MS 2 por la técnica de microdilución en caldo	151
Figura 21: Actividad antibacteriana del ED de JR NG sobre	

<i>S. aureus</i> MR 2 por la técnica de difusión en pozo	153
Figura 22: Actividad antibacteriana del EE de JR C sobre	
<i>S. aureus</i> MR 2 por la técnica de difusión en pozo	155
Figura 23: CCD del EE de JR NG	161
Figura 24: CCD del EE de JR C	161
Figura 25: CCD del EH de JR C	161
Figura 26: Bioautografía del EE de JR C (2,3 /cromatofolio) sobre	
<i>S. aureus</i> MS 1	164
Figura 27: Bioautografía del EE de JR NG (2,3 /cromatofolio) sobre	
<i>S. aureus</i> MS 1.....	164
Figura 28: Bioautografía del EH de JR C (2,3 mg/cromatofolio) sobre	
<i>S. aureus</i> MS 1	165
Figura 29: Bioautografía del EE de JR C (0,75 mg/cromatofolio) sobre	
<i>S. aureus</i> MS 1	166
Figura 30: Bioautografía del EE de JR NG (0,75 mg/cromatofolio) sobre	
<i>S. aureus</i> MS 1	167
Figura 31: Bioautografía del EE de JR C (0,75 mg/cromatofolio) sobre	
<i>S. aureus</i> A	168
Figura 32: Bioautografía del EE de JR C (0,75 mg/cromatofolio) sobre	
<i>E. coli</i> B	169
Figura 33: Cromatograma de la FLA de JR C y del 10-HDA	171
Figura 34: Actividad antibacteriana de FLA de JR C sobre	
<i>S. aureus</i> MS 1 por la técnica de microdilución en caldo	173
Figura 35: Cromatograma obtenido tras la inyección de la	
FLA de JR C en GC-FID	174
Figura 36: Cromatograma obtenido tras la inyección del	
patrón 10-HDA en GC-FID	175

Tabla 1: Clasificación taxonómica de las abejas	35
Tabla 2: Exigencias del CAA con respecto a las propiedades físicoquímicas de jalea real virgen y liofilizada	43
Tabla 3: Microbiota normal de piel	54
Tabla 4: Preparación de las diluciones de jalea real	91
Tabla 5: Cepas bacterianas de referencia	93
Tabla 6: Cepas bacterianas aisladas de infecciones superficiales en seres humanos	94
Tabla 7: Cepas bacterianas aisladas de mastitis en bovinos	94
Tabla 8: Cepas bacterianas aisladas de diversos orígenes	95
Tabla 9: Concentración de jalea real evaluada por la técnica de dilución en tubo	98
Tabla 10: Características físicoquímicas de las muestras de jalea real estudiadas en comparación con lo exigido por el CAA para jalea real virgen no liofilizada	111
Tabla 11: Estandarización del inóculo bacteriano de cada cepa a ensayar	119
Tabla 12: Actividad antibacteriana de JR R y JR NG por la técnica de dilución en tubo	121
Tabla 13: Actividad antibacteriana de JR R en % p/p por la técnica de difusión en pozo	128
Tabla 14: Actividad antibacteriana de JR NG en % p/p por la técnica de difusión en pozo	131
Tabla 15: Actividad antibacteriana de JR C en % p/p por la técnica de difusión en pozo	135
Tabla 16: Actividad antibacteriana de JR LP en % p/p por la técnica de difusión en pozo	142
Tabla 17: CIM promedio y desvíos estándares para cada grupo bacteriano, incluyendo las cuatro muestras	146
Tabla 18: CIM promedio y desvíos estándares para cada muestra, incluyendo los cuatro grupos bacterianos	147
Tabla 19: Actividad antibacteriana de JR C por la técnica de microdilución en caldo	150

Tabla 20: Actividad antibacteriana del EE y ED de JR NG sobre cepas aisladas de infecciones superficiales en seres humanos y de mastitis en bovinos por la técnica de difusión en pozo	152
Tabla 21: Actividad antibacteriana del EE y ED de JR C sobre cepas aisladas de infecciones superficiales en seres humanos y de mastitis en bovinos por la técnica de difusión en pozo	154
Tabla 22: Actividad antibacteriana del EE y ED de JR LP sobre cepas aisladas de infecciones superficiales en seres humanos y de mastitis en bovinos por la técnica de difusión en pozo	156
Tabla 23: Actividad antibacteriana de la FLA del EE de JR C y de 10-HDA por técnica de microdilución en caldo	172

- **10-HDA**: ácido trans 10-hidroxi-2-decenoico
- **Å**: Angstrom
- **ACC**: Agar Cerebro Corazón
- **ACS**: Agar Crecimiento *Streptococcus*
- **AMH**: Agar Müeller-Hinton
- **ANOVA**: Análisis de Varianza
- **AOAC**: Association of Official Analytical Chemists
- **ATS**: Agar Trypticosa Soya
- **°C**: grados centígrados
- **CAA**: Código Alimentario Argentino
- **CBM**: Concentración Bactericida Mínima
- **CCC**: Caldo Cerebro Corazón
- **CCD**: cromatografía en capa delgada
- **CIM**: Concentración Inhibitoria Mínima
- **cm**: centímetros
- **cm²**: centímetro cuadrado
- **CMH**: Caldo Müeller-Hinton
- **CNS**: *Staphylococcus* coagulasa negativos
- **CTS**: Caldo Trypticosa Soya
- **DMSO**: dimetil sulfóxido
- **ED**: extracto desgrasado
- **EE**: extracto etéreo
- **EH**: extracto hexánico
- **Et**: éter etílico
- **FAME**: ésteres metílicos de los ácidos grasos
- **FE**: fase estacionaria
- **FID**: detector de ionización de llamas
- **FLA**: fracción lipídica activa
- **FM**: fase móvil
- **FODA**: Fortalezas, Oportunidades, Debilidades y Amenazas
- **g**: gramos
- **GC**: cromatografía gaseosa

- **GC-FID**: cromatografía gaseosa con detector de ionización de llamas
- **h**: horas
- **H**: hexano
- **HPLC**: cromatografía líquida de alta eficacia
- **JR C**: Jalea real Corrilobo
- **JR LP**: Jalea real La Pampa
- **JR NG**: Jalea real Norte Grande
- **JR R**: Jalea real Regional
- **kDa**: kilo Dalton
- **L**: litro
- **LC**: cromatografía líquida
- **LEL**: Leche Extracto de Levadura
- **log₁₀**: diluciones logarítmicas en base 10
- **log₂**: diluciones logarítmicas en base 2
- **M**: molar
- **mg**: miligramos
- **min**: minutos
- **mL**: mililitro
- **mm**: milímetros
- **MR**: metilino resistente
- **MRJPs**: principales proteínas de la jalea real (apalbúminas)
- **MS**: metilino sensible
- **N**: normalidad
- **N₂**: Nitrógeno gaseoso
- **NCCLS**: National Committee for Clinical Laboratory Standards
- **NiCr**: Níquel Cromo
- **nm**: nanómetros
- **P**: presión
- **PM**: peso molecular
- **p/p**: peso/peso
- **p/v**: peso/volumen
- **PBPs**: proteínas de unión a penicilina

- **PBP2a**: proteína alterada de unión a penicilina
- **PROAPI**: Programa Apícola
- **RCS**: recuento de células somáticas
- **R_f**: Factor de retención
- **rpm**: revoluciones por minuto
- **SAGPyA**: Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación de la Nación
- **SARM**: *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina
- **SASM**: *Staphylococcus aureus* sensible a meticilina
- **TTC**: cloruro de 2,3,5 - trifenil tetrazolio
- **UFC**: unidades formadoras de colonias
- **UV**: ultravioleta
- **V**: voltios
- **λ**: longitud de onda
- **μA/V**: micro Amper / voltios
- **μg**: microgramo
- **μL**: microlitro
- **μm**: micrómetro



INTRODUCCIÓN

1. Resistencia a antimicrobianos

Debido a su gran capacidad de adaptación, las bacterias pueden desarrollar resistencia frente a los antibióticos. Se entiende por resistencia al mecanismo mediante el cual la bacteria puede disminuir o evitar la acción de los agentes antimicrobianos. Desde un punto de vista práctico una bacteria es sensible a un antibiótico cuando éste es eficaz frente a ella y es capaz de curar la infección; por el contrario, es resistente cuando su crecimiento sólo puede ser inhibido a concentraciones superiores a las que el fármaco puede alcanzar en el lugar de la infección (Cordiés Jackson y col., 1998).

Existe una resistencia natural o intrínseca que es una propiedad específica de las bacterias y su aparición es anterior al uso de los antibióticos; ocurre cuando la bacteria carece de diana (estructura o mecanismo bioquímico necesarios para la multiplicación o supervivencia) para un determinado antibiótico, como por ejemplo la falta de pared celular en especies de *Mycoplasma* en relación con los antibióticos β -lactámicos. Por otro lado, la resistencia adquirida es la realmente importante desde el punto de vista clínico: se debe a la modificación de la carga genética de la bacteria que puede aparecer por una mutación cromosómica espontánea (que puede ir seguida de un proceso de selección de las mutantes resistentes, por ejemplo a rifampicina o macrólidos), o por mecanismos de transferencia genética mediada por plásmidos, transposones o integrones, que pueden ser transferidos de una bacteria a otra.

Una cepa bacteriana puede desarrollar varios mecanismos de resistencia frente a uno o varios antibióticos y, del mismo modo, un antibiótico puede ser inactivado por distintos mecanismos por diversas especies bacterianas. Las cepas resistentes se hacen predominantes por la presión selectiva de los antibióticos que eliminan a las bacterias sensibles, no estando implicados solamente los antibióticos utilizados en medicina humana, sino también aquellos empleados en medicina veterinaria.

Las bacterias adquieren resistencia a los antibióticos desarrollando mecanismos que le impiden ejercer su acción. Los mecanismos de resistencia de las bacterias son fundamentalmente tres:

♣ ***Inactivación del antibiótico por enzimas:*** La bacteria produce enzimas que inactivan al antibiótico; las más importantes son las β -lactamasas que son serina proteasas que

hidrolizan el anillo β -lactámico de la penicilina. Muchas bacterias las producen, como por ejemplo los estafilococos. En las bacterias Gram positivo suelen ser plasmídicas, inducibles y extracelulares y, en las bacterias Gram negativo, son tanto de origen plasmídico como mediadas por transposones, ya sean constitutivas o periplásmicas.

♣ **Modificaciones bacterianas que impiden la llegada del antibiótico al sitio diana:**

Las bacterias producen mutaciones en las porinas de la pared celular que impiden la entrada de ciertos antibióticos (como por ejemplo los β -lactámicos) o que alteran los sistemas de transporte (por ejemplo los aminoglucósidos en los microorganismos anaerobios). En otras ocasiones pueden provocar la salida del antibiótico por un mecanismo de expulsión activa, impidiendo que éste se acumule en cantidad suficiente como para poder actuar eficazmente.

♣ **Alteración por parte de la bacteria de su sitio diana:** esto impide o dificulta la acción del antibiótico. Aquí podemos contemplar las alteraciones a nivel de la ADN girasa (resistencia a quinolonas), del ARNr 23S (resistencia a macrólidos) y de las enzimas PBPs (proteínas de unión a penicilina) necesarias para la formación de la pared celular y situadas en la membrana citoplasmática de las bacterias (resistencia a antibióticos β -lactámicos). Este último ejemplo hace referencia a la presencia del gen de resistencia a meticilina, *mecA*, que codifica para la producción de una proteína alterada de unión a penicilina (PBP2a) y que posee una baja afinidad por los antimicrobianos β -lactámicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapenems) (Lowy, 1998; Scott Weese y van Duijkeren, 2010).

El uso erróneo o innecesario de antimicrobianos constituye uno de los gastos más importantes de estos fármacos en el ámbito extrahospitalario y potencia la aparición de cepas resistentes a los antibióticos de uso asiduo. El consumo (uso y/o abuso) de los antibióticos influye en la generación de resistencias, no sólo en las bacterias patógenas, sino también en las saprofitas y oportunistas (Daza Pérez, 1998).

Durante la década del setenta (siglo XX), los investigadores se vieron forzados a abandonar su creencia de que, debido a la existencia de una amplia variedad de agentes antimicrobianos efectivos, todas las infecciones bacterianas eran tratables. Su optimismo fue desplazado por la aparición de resistencia múltiple a antibióticos de

patógenos tales como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Mycobacterium tuberculosis*. La evolución del incremento de la resistencia de especies bacterianas a los antimicrobianos, surge de una multitud de factores que incluyen el extenso y a veces inapropiado uso de sustancias antimicrobianas, la utilización de estos agentes como mejoradores del crecimiento en alimentación animal y la relativa facilidad con la cual estas bacterias resistentes a los antimicrobianos cruzan barreras geográficas debido al aumento de los viajes regionales e internacionales (Lowy, 2003).

El problema de la multiresistencia bacteriana se agrava con el pasar del tiempo si se considera que investigaciones, tanto clínicas como epidemiológicas, han demostrado que cada vez son menores las barreras que impiden la transferencia de genes de resistencia entre los microorganismos patógenos, inclusive entre bacterias pertenecientes a géneros y familias diferentes, como así también la transferencia horizontal de bacterias resistentes de los animales al hombre y viceversa (Miller y Bartlett, 2004). Debido a que el uso de los antibióticos se ha extendido desde hace más de cincuenta años, las bacterias han ido desarrollado una resistencia progresiva ocasionando un importante problema de salud en todo el mundo (Hsueh y col., 2005). La resistencia adquirida a los antimicrobianos en bacterias es una amenaza cada vez mayor para los seres humanos, así como también para los animales (Bengtsson y col., 2009). En consecuencia, continuamente se realizan esfuerzos científicos para estudiar y desarrollar nuevos compuestos con acción antimicrobiana, que no sean contaminantes y distintos de la terapia antibiótica convencional, tal como la jalea real o sus componentes activos, que son el tema de investigación del presente trabajo de Tesis Doctoral donde se propone utilizarlos como una alternativa de tratamiento, por ejemplo, contra los microorganismos causantes de infecciones superficiales en seres humanos y de mastitis en bovinos.

2. Sustancias naturales con actividad antimicrobiana

En los últimos años se ha presenciado un renacimiento de productos naturales tradicionales en medicina y en conservación de alimentos y cosméticos. Hay un interés creciente en los productos naturales, debido a su disponibilidad, menores efectos

colaterales y baja toxicidad así como también mejor biodegradabilidad, cuando se comparan con aquellos antibióticos y conservantes sintéticos (Kalemba y Kunicka, 2003). Estos incluyen cepas probióticas (Reid, 2001; Petti y col., 2008), nuevos compuestos orgánicos (Hoellman y col., 2002), péptidos (Yau y col., 2001), extractos de plantas (Tereschuk y col., 2004; Chomnawang y col., 2009; González y Marioli, 2010), aceites esenciales de plantas (Halcón y Milkus, 2004; González y Marioli, 2010), alimentos naturales como el kéfir (Leite Rodrigues y col., 2005), la miel (Basualdo y col., 2007; Molan, 2002), el propóleo (Sawaya y col., 2004) y la jalea real (Ratanavalachai y Wongchai, 2002; Eshraghi, 2005).

Actualmente, existe una demanda creciente por nuevas sustancias con capacidad antimicrobiana, principalmente debido a los problemas de resistencia a los antibióticos de uso extendido. Desde este punto de vista, tanto los hongos como las bacterias han sido estudiados como fuentes de nuevos antibióticos. Sin embargo, hace muy poco tiempo que los insectos, uno de los grupos más diversos y numerosos de organismos eucariotas del planeta, comenzaron a ser investigados en relación con sustancias antimicrobianas (Fontana y col., 2004; Holden, 1989). A pesar de que no poseen un sistema inmunitario basado en linfocitos, los insectos son capaces de eliminar efectivamente a las bacterias, aún adquiriendo inmunidad transitoria (Boman, 1991; Boman, 1995; Bullet y col., 1999; Zasloff, 1992). Esto sugiere la existencia de compuestos con potente actividad antimicrobiana producidos por ellos, lo que hace atractivo al sistema inmune de los insectos para la investigación y el desarrollo de nuevas medicinas basadas en dicha actividad (Fontana y col., 2004). Entre los insectos productores de sustancias antimicrobianas, se está estudiando a las abejas, debido a que desde hace muchos años se sabe que los productos elaborados por ellas (miel, jalea real, propóleos, apitoxina y cera) poseen propiedades beneficiosas para la salud (Basualdo y col., 2007; Eshraghi, 2005; Mendizábal, 2005; Molan, 2002; Ratanavalachai y Wongchai, 2002; Sawaya y col., 2004).

3. Las abejas

Las abejas melíferas son insectos sociales que sólo pueden sobrevivir como miembros de una comunidad, llamada colonia, nido o colmena. Se estima que se

originaron de avispas cazadoras durante el período Cretáceo (entre 74 y 146 millones de años atrás).

Antiguamente fueron llamadas “mielíferas o melíferas” (que llevan miel) pues se creía que las plantas producían la miel y las abejas las transportaban a la colmena. Estudios posteriores demostraron que la abeja produce la miel a partir del néctar de las flores, por lo que el término más correcto sería “melífica” (que produce miel). Sin embargo aún se las sigue identificando con la primitiva denominación (Mendizábal, 2005).

3.1. Clasificación taxonómica

La Tabla 1 muestra la clasificación taxonómica de las abejas

Tabla 1: Clasificación taxonómica de las abejas

Reino	Animal
Subreino	Metazoarios
División	Artizoarios
Rama	Artrópodos
Clase	Insectos
Orden	Himenópteros
Familia	Ápidos
Género	Apis
Especie	<i>mellifera</i> o <i>mellifica</i> (L)
Nombre científico	<i>Apis mellifera</i> o <i>mellifica</i> (L)

3.2. Las razas apícolas más importantes

Hay muchas especies de abejas pero sólo cuatro de ellas son melíficas: las asiáticas *Apis florea*, *Apis indica* y *Apis dorsala*, y la abeja *Apis mellifera*. Esta última es la más desarrollada en la apicultura, probablemente originaria de África o Europa y fue introducida en América durante la colonización europea. También habita en Australia, Nueva Zelanda, Japón y China. Como su adaptación fue diferente en cada

zona, se generaron distintas subespecies, comúnmente llamadas razas, las que presentan ventajas y desventajas para la apicultura.

La raza italiana es la de mayor interés económico para los apicultores de todo el mundo. También son apreciadas entre los productores las razas caucásica y carniola. En Argentina también está difundida naturalmente la llamada raza negra o criolla originada a partir de abejas traídas de España y Alemania a mediados del siglo XIX. Otras razas son Chipriota, Macedonia, Siciliana, Sirias, etc. Hay razas como la Buckfast, que fueron desarrolladas por cruza, para combinar mejores propiedades de adaptabilidad, producción y mansedumbre. Existen por lo menos once razas de abejas africanas. Todas ellas son adaptaciones genéticas de la especie *Apis mellifera* a diversas geografías (Mendizábal, 2005).

3.3. La colmena

El hogar de las abejas se denomina colmena y está compuesta por tres castas diferentes: una sola abeja reina (hembra fértil), los zánganos (machos) y las abejas obreras (hembras estériles) (Figura 1). Estas castas están asociadas a diferentes funciones en la colonia; cada una posee sus propios instintos especiales respecto a las necesidades de la comunidad (Cruzado y col., 2007). En primavera y verano, sólo las abejas obreras más viejas (entre el 30 y 40% de la población) se encargan de pecorear (recolectar los alimentos de las flores). Las restantes trabajan dentro de la colmena, en su mayoría alimentando a las crías. En invierno, salvo días excepcionalmente cálidos, no salen a recolectar. Tampoco tienen crías para alimentar.

Como la reina es la única hembra de la colmena que queda fecundada por los zánganos, es por ende la única madre de futuras reinas criadas para reemplazarla, de los zánganos y de las abejas obreras (hembras con órganos sexuales atrofiados, por lo que no pueden ser fecundadas). Los zánganos (los machos de la colmena) nacen de huevos de la reina no fecundados (esto se denomina “partenogénesis”, que significa “nacido de virgen”). A veces, por ausencia de reina e imposibilidad de crear una nueva reina en reemplazo, algunas obreras también ponen huevos no fecundados de zánganos. Los zánganos no fecundan a la reina de la misma colmena, ya que éstos son sus propios

hijos y, si la fecundasen, habría endocrías perniciosas con incremento de defectos observados en las descendencias (Mendizábal, 2005).

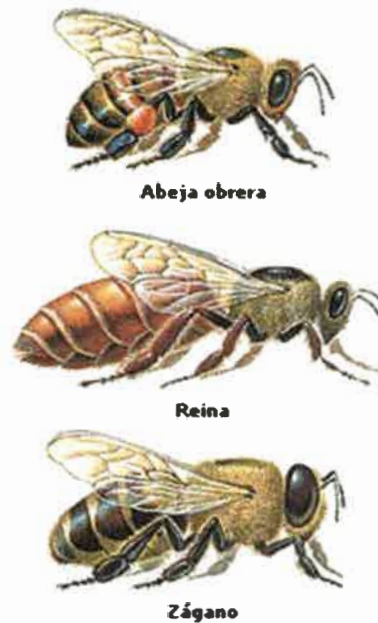


Figura 1: Las diferentes castas de la colmena de abejas

Fuente: www.carlospachas.blogspot.com

Las abejas obreras superan siempre en número, con gran diferencia, a los zánganos. En primavera, en una colonia de zona templada, el número de obreras varía entre 8.000 y 15.000 y a comienzos del verano, puede llegar a ser superior a 80.000. Aunque carecen de la capacidad de aparearse y reproducirse, las obreras segregan cera, construyen el panal, recogen néctar, polen y agua, transforman el néctar en miel, producen la jalea real (alimento de la abeja reina, como veremos más adelante), limpian la colmena y, en caso de necesidad, la defienden (Expo Ciencia, 2002).

El polen es la principal fuente de proteínas, grasas, minerales y vitaminas de las abejas, principios alimenticios esenciales para el crecimiento y desarrollo de las tres castas. Las abejas adultas pueden subsistir a base de miel o azúcar, una dieta de carbohidratos puros. Además de recolectar y almacenar alimento para todos los miembros de la comunidad, las obreras son las responsables de defender la colonia y de mantener la zona de puesta a 34 °C, temperatura óptima para la incubación de los huevos y el desarrollo de las crías. Durante las tres primeras semanas de vida adulta, las

obreras dedican sus labores a construir el panal, limpiar y pulir las celdas, alimentar a las larvas y a la reina, controlar la temperatura, evaporar el agua del néctar hasta que toma la consistencia de una miel espesa y otras muchas y variadas tareas. Al final de este periodo trabajan como recolectoras y defensoras de la colonia. El zángano carece de aguijón y de defensa alguna; no tiene cestillo para el polen ni glándulas productoras de cera, y no puede segregar jalea real. Su única función es aparearse con las nuevas reinas (Vit, 2004).

3.4. La abeja reina

Un apicultor inglés, Butler, fue el primero entre los escritores apícolas que hizo público, en 1609, en su libro “*Monarquía femenina*”, que el rey de las abejas era realmente una reina, porque él la había visto aovar (Mendizábal, 2005).

La abeja reina nace de un huevo exactamente igual al de las obreras; las larvas de la abeja reina son alimentadas con jalea real (igual que las de las obreras y zánganos) los tres primeros días de vida. A partir de entonces, a las futuras obreras y zánganos se les cambia la dieta (polen y néctar o miel), mientras que las abejas obreras siguen alimentando a la futura reina con jalea real, el que será su alimento exclusivo durante toda su vida (Figura 2). La diferencia en la administración de tan extraordinario alimento hace que la abeja reina tenga un ciclo evolutivo, es decir, un desarrollo físico, una capacidad genética y una longevidad claramente diferenciada (Mendizábal, 2005).

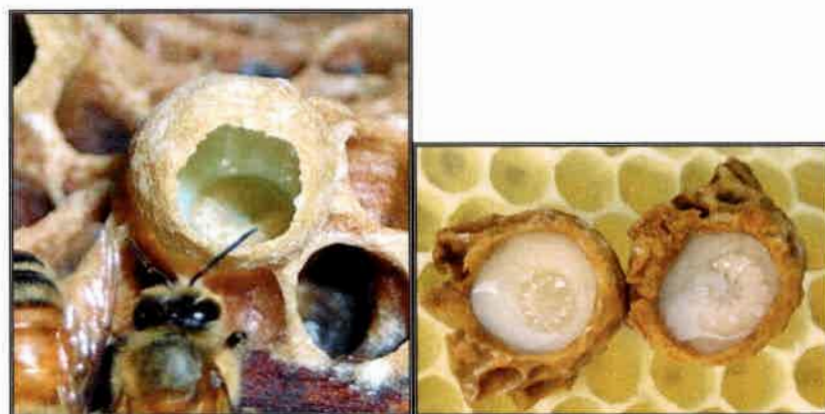


Figura 2: Larvas de abejas reinas creciendo en jalea real

Fuente: www.wikipedia.org/wiki/Jalea_real.es

La abeja reina posee órganos reproductivos altamente desarrollados y procrea intensamente. En primavera y verano, y en condiciones climáticas normales, la postura de huevos oscila entre 1.500 y 2.000 huevos por día. En cambio, las abejas obreras son estériles porque poseen órganos sexuales atrofiados, justamente debido a la alimentación diferencial entre estas y la abeja reina. Desde el punto de vista anatómico, la reina es muy distinta a los zánganos y a las obreras. Su cuerpo es largo, con un abdomen mucho mayor que el de una abeja obrera. Sus mandíbulas están armadas con afilados dientes cortantes, posee un aguijón curvado y liso que puede usar una y otra vez en caso de peligrar su vida. La reina carece de las herramientas de trabajo que poseen las obreras, como cestas para el polen, glándulas que segregan cera y una vejiga bien desarrollada para la miel (Mendizábal, 2005). La vida de una abeja reina es de aproximadamente 5 años, pero a partir del primer año de vida comienza a disminuir la postura de huevos. Por el contrario, las obreras tienen una esperanza de vida de tan sólo 30 a 45 días (Salazar-Olivo y Paz-González, 2005).

3.5. Productos elaborados por las abejas

Las abejas elaboran diferentes productos que son útiles para su subsistencia y que, además, son utilizados por el hombre. Entre ellos se encuentran la apitoxina (veneno de las abejas), cera, propóleo, miel y jalea real. A continuación se incluyen algunas de sus características y usos:

♣ **La apitoxina:** Es el veneno que las abejas obreras generan para defenderse cuando creen peligrar su colmena y, en segundo orden, cuando corre riesgo su vida. Es un líquido ácido y transparente; el 50% de su principio tóxico es un péptido denominado melitina. Es muy utilizado por el hombre porque, empleado convenientemente, es un remedio curativo y profiláctico que actúa sobre un órgano aislado, sobre una enfermedad determinada o sobre el conjunto del organismo (por ejemplo en las afecciones reumáticas).

♣ **La cera:** Es una sustancia segregada por glándulas situadas en el vientre de abejas obreras que ellas producen para fabricar el panal y para cerrar y reparar las celdas.

Básicamente, es ácido cerótico con pequeñas inclusiones de ácido palmítico, que químicamente se puede descomponer en miricina, cerina y ceroleína. Es utilizada por el hombre para conformar panales de cera estampada artificiales, moldes, velas, etc.

♣ **El propóleo:** Es una sustancia resinosa que las abejas extraen de árboles y mezclan con cera para proteger a la colmena. Lo utilizan para cerrar fisuras y rajaduras de la colmena, para soldar panales entre sí y las paredes, para cubrir superficies y evitar así diferentes contaminaciones. Es considerado un antibiótico natural por sus propiedades bactericidas y bacteriostáticas; es utilizado en veterinaria en mastitis de bovinos. El hombre lo utiliza en barnices, como ingrediente de golosinas dietéticas, cremas y jabones (Mendizábal, 2005).

♣ **La miel:** Es una sustancia viscosa y dulce elaborada por las abejas obreras a partir del néctar de las flores o de exudaciones de otras partes vivas de las plantas, que dichas abejas recogen, transforman y combinan con sustancias específicas propias y almacenadas en los panales, donde madura hasta completar su formación (Código Alimentario Argentino, 2010a). La miel posee propiedades, que pueden ser nutritivas, biológicas y terapéuticas. Ha sido utilizada con éxito en el tratamiento de heridas y quemaduras, observándose que a diferencia de otros antisépticos tópicos que dañan los tejidos, la miel estimula el desarrollo de las células epiteliales, disminuye la inflamación y favorece la cicatrización (González y Del Dedo Torre, 2004). La miel como remedio terapéutico fue descubierta por nuestros antepasados de forma empírica y fue utilizada para tratar las heridas infectadas antes de que las bacterias fueran descubiertas como la causa de las infecciones. Los diferentes aspectos de las propiedades antibacterianas de la miel han sido revelados recientemente (Molan, 1999) y se ha determinado que la miel tiene un efecto inhibitorio sobre unas 60 especies bacterianas, incluyendo microorganismos aerobios y anaerobios, Gram positivo y negativo (Molan, 1992). Existen dos clases de agentes antibacterianos o también llamados “inhibinas” en la miel; uno de ellos es el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), sensible a la luz y al calor, el cual es producido enzimáticamente (White y col., 1963). El otro agente antibacteriano se denomina no-peróxido, el cual no es sensible a la luz y al calor y permanece intacto después del almacenamiento de la miel por largos períodos (Bogdanov, 1997; Bunting,

2001). Éstos factores no-peróxidos se asocian a componentes fitoquímicos, es decir a componentes químicos de las plantas tales como: terpenos, alcohol bencílico, ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxibenzoico, entre otros (Allen, 1991). Según Molan (Molan, 2000; Molan, 2001) la principal actividad antibacteriana de la miel es debida al peróxido de hidrógeno producido a partir de la oxidación de glucosa en presencia de la enzima glucosa-oxidasa, secretada por la glándula hipofaríngea de la abeja en el néctar para asistir a la formación de miel. Existen además otros factores antibacterianos a tener en cuenta, entre ellos: el efecto osmótico (la miel presenta un elevado contenido de azúcares), la acidez (bajo pH), los componentes adicionales, como lisozima, flavonoides y sustancias volátiles (Bogdanov, 1984; Dustmann, 1979).

♣ **La jalea real:** Es una secreción nutritiva producida por el sistema de glándulas cefálicas (hipofaríngeas y mandibulares) de abejas obreras (*Apis mellifera* L.) involucrada en la determinación sexual y en la longevidad de la abeja reina (Antinelli y col., 2002). Es una secreción de consistencia cremosa, blanco-amarillenta, ácida, con olor y sabor ligeramente picantes (Fontana y col., 2004) (Figura 3). La jalea real es parcialmente soluble en agua y altamente ácida (pH 3,4-4,5) debido a la presencia de una gran cantidad de ácidos y con una densidad de 1,1 g/mL (Lercker, 2003).

Como la jalea real es el tema central del presente trabajo de Tesis Doctoral, a continuación se ampliará la información acerca de la misma.

4. La jalea real

Como se explicó anteriormente, en la colmena, la jalea real es el alimento de las larvas de abejas obreras y zánganos hasta su tercer día, pero es el alimento exclusivo de las larvas de abejas reinas y de las reinas adultas durante toda su vida. Es por esto que se considera a la jalea real como la principal causa de las significativas diferencias morfológicas y funcionales entre la reina y las abejas obreras (Chen y Chen, 1995; Peixoto y col., 2009).



Figura 3: Jalea real virgen

Fuente: www.apicolabalcarse.com.ar

4.1. Composición

La composición de la jalea real es variable, dependiendo del estado fisiológico y metabólico de las abejas obreras, de la estación y de la región geográfica. El polen es el principal precursor de la jalea real. El polen contiene una gran variedad de sustancias (proteínas, glucósidos y sus derivados) y diferentes tipos de metabolitos secundarios. La composición de la jalea real se correlaciona significativamente con el origen botánico de la materia prima natural (Bonomi y col., 1986).

Desde el punto de vista químico, la jalea real está compuesta por agua, proteínas caracterizadas por poseer un alto valor biológico, carbohidratos, lípidos como el ácido graso específico trans 10-hidroxi-2-decenoico (10-HDA, por sus siglas en inglés) que también posee un alto valor biológico, minerales, aminoácidos libres y vitaminas (Simuth, 2004). La fructosa y la glucosa en conjunto representan el 90% de azúcares totales, mientras que el contenido en sacarosa varía considerablemente de una muestra a otra. Otros azúcares como maltosa, trehalosa, melobiosia, ribosa y eritrosa, están presentes en bajas cantidades (Lercker, 1986).

Además, es una excelente fuente de vitaminas del complejo B, como riboflavina (vitamina B2), tiamina (vitamina B1) y en particular ácido pantoténico (vitamina B5) que es el más abundante. Posee también ácido fólico, vitamina E y ácido nicotínico (vitamina PP). Contiene también los minerales, en orden decreciente: K, Na, Zn, Fe, Cu y Mn (Mendizábal, 2005). La jalea real posee todos los aminoácidos esenciales para el ser humano. Se han identificado 29 moléculas que incluyen aminoácidos y sus derivados, de los cuales los más importantes son el ácido aspártico y el ácido glutámico. También están presentes una serie de enzimas, como por ejemplo glucoxidasa, fosfatasa

y colinesterasa (Chen y Chen 1995). Las diferencias en el contenido de ácidos grasos, aminoácidos, nucleótidos, hormonas y vitaminas juegan un importante papel en la diferencia del desarrollo de las abejas obreras y la reina (Lercker y col., 1984; Stocker, 2003).

4.2. Definición de jalea real según el Código Alimentario Argentino

“Con la denominación de jalea real, papilla real o leche de abeja, se entiende el alimento de la larva de la abeja reina hasta el tercer o cuarto día de vida, constituido por la secreción de las glándulas de la cabeza de abejas jóvenes (5-15 días de vida). Se presenta como una masa viscosa, de aspecto lechoso, color amarillo pálido, sabor ligeramente ácido y olor característico” (Código Alimentario Argentino, 2010b).

Las exigencias del Código Alimentario Argentino (CAA) con respecto a las propiedades fisicoquímicas de la jalea real virgen y liofilizada se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2: Exigencias del CAA con respecto a las propiedades fisicoquímicas de jalea real virgen y liofilizada

Características	Jalea real virgen	Jalea real liofilizada
Humedad, secado 12 h a 70 °C	60-70%	5-10%
pH, solución al 5 % (p/v) a 20 °C	3,4-4,5	NC
Índice de acidez (mg KOH)	23-48	NC
Proteínas, N x 6,25	11-15%	27-40%
Azúcares reductores, como glucosa	10-15%	11-26%
Sacarosa, máximo	5%	10%
Relación azúcares reductores/proteínas	0,8-1,2	NC
Lípidos totales	5-7%	10-35%
Lípidos ácidos	4,3-5%	NC
Cenizas, a 500 °C	0,8-1%	2-5%
Fósforo, como P	150-250 mg/100 g	1.800-3.500 mg/100 g

Nota: NC: valores No Contemplados por el CAA

4.3. Forma de producción

La recolección o cosecha de jalea real se puede realizar de varias formas, uno de los métodos comúnmente utilizados consiste en dejar huérfana una colmena fuerte durante 3 a 4 días y agregarle una cría muy joven para que, con el deseo de crear nuevas reinas, las nodrizas segreguen jalea real para alimentarlas. Al término de estos días se quitan los cuadros con las celdas reales y se recolecta la jalea. Para ello se retira la larva de cada celda con una pinza y se extrae la jalea real celda por celda con una manguera conectada a una bomba de vacío, lo que representa un arduo trabajo manual. Para mantener la producción, es necesario introducir cuadros con cría abierta periódicamente o devolver la reina de la colonia y rotar la extracción con otras colmenas. Se requiere de la filtración para retener los restos de las larvas. Se puede obtener una producción de 500 g/colmena; para ello se requiere de ciertas condiciones que el apicultor deberá tener en cuenta:

- ✓ El medio ambiente adecuado para la vida de las abejas, sin los riesgos de mortalidad (por ejemplo, plaguicidas).
- ✓ Posibilidad de una constante y continua presencia de polen y néctar de las flores.
- ✓ Disponer de colmenas fuertes con reinas jóvenes, bien pobladas de abejas obreras (Mendizábal, 2005).

4.4. Propiedades farmacológicas de la jalea real

En un principio, la jalea real fue utilizada porque se observaba un efecto de rejuvenecimiento en el ser humano. Además, los consumidores de jalea real, afirmaban que la misma resolvía la mayor parte de sus problemas de salud, en muchos casos, enfermedades crónicas, para las que otros tratamientos no habían dado lugar a resultados deseados, considerando a los obtenidos a partir de la jalea real casi milagrosos. La jalea real debe administrarse por vía oral durante 1-2 meses y dejarla tiempo suficiente para fundir bajo la lengua en dosis de 200 - 500 mg por día; de ésta manera sirve como un tónico y estimulante, con un efecto de euforia en los seres humanos de buena salud. No hay pruebas de que los efectos sean atribuibles exclusiva

o principalmente a la jalea real. La ingesta de jalea real, por lo general, está asociada con una sensación de bienestar general (Mendizábal, 2005).

Además de sus propiedades nutritivas por excelencia, se ha demostrado que la jalea real también posee una variada acción farmacológica en experimentos *in vivo* e *in vitro*, que incluyen vasodilatación y actividad hipotensiva, incremento en la velocidad de crecimiento, acción desinfectante, actividad antitumoral, actividad antihipercolesterolemica, actividad antiinflamatoria (Nagai e Inoue, 2004; Salazar-Olivo y Paz-González, 2005) y acción antimicrobiana. (Fontana y col., 2004; Melliou y Chinou, 2005; Fujiwara y col., 1990; Hornitzky, 1998; Eshraghi, 2005; Bilikova y Simuth, 2001; Bachanova y col., 2002; Ratanavalachai y Wongchai, 2002).

Los múltiples efectos de la jalea real ofrecen una multitud de posibles campos de aplicación en medicina y farmacia. La actividad antioxidante de muestras de jalea real fue comparable a las de propóleos y miel (Nagai y col., 2001). Debido a la capacidad de eliminación del radical anión superóxido, la jalea real se puede utilizar como antioxidante, como antiinflamatorio y en la cicatrización de las lesiones cutáneas (Fujii y col., 1990). La jalea real contiene factores de crecimiento que promueven el crecimiento de células de insectos, así como también se ha demostrado que posee acción comparable a la de la insulina sobre adipositos de ratón (Salazar-Olivo y Paz-González, 2005). En tratamientos con jalea real se observó el aumento de los niveles de glóbulos rojos, glóbulos blancos y de plaquetas (Stocker, 2003).

4.5. Usos de la jalea real

♣ **Como ingrediente de productos alimenticios:** Probablemente el uso más común de la jalea real sea como ingrediente en una mezcla de 1 - 3% con miel. Entre las ventajas de este producto se encuentran la facilidad de producción, que no requiere ninguna tecnología especial, y la capacidad de la miel de enmascarar cualquier cambio en la apariencia visible en la jalea real. El producto final es agradable al gusto y posee los efectos beneficiosos de ambos productos. No hay información sobre la preservación de jalea real en esta formulación. Sin embargo, se recomienda que se almacene en condiciones de refrigeración. Otro de los alimentos a veces enriquecido con jalea real en algunos países europeos es el yogur, el cual tiene una acidez similar y también debe

conservarse refrigerado. Una variedad de suplementos vitamínicos y de jugos de frutas están fortificados con jalea real liofilizada y, la misma es, además, ampliamente utilizada en la preparación de bebidas.

♣ **Como ingrediente de productos farmacéuticos:** Esta categoría incluye diferentes tipos de suplementos dietéticos. Sin embargo, para su producción, se requiere una tecnología más avanzada y un mayor control y garantías sobre la calidad del producto. Por las mismas razones, muchas de estas formulaciones se obtienen a partir de jalea real liofilizada. Lamentablemente, no siempre el precio de estos productos refleja las características inherentes, de manera que, a menudo, se venden a precios mucho más altos que su valor real. La jalea real es generalmente incluida en formulaciones farmacéuticas para obtener efectos estimulantes, pero también se utiliza para resolver problemas concretos de salud, como tratamiento de la hipertensión por su acción vasodilatadora. La jalea real no deberá utilizarse nunca como un sustituto de medicamentos, a menos que el tratamiento con jalea real haya sido previamente aprobado por un médico competente. En las formulaciones, la jalea real puede ser el único principio activo, o puede encontrarse mezclada con otros productos.

♣ **Como ingrediente de los productos cosméticos:** Excepto en Asia, probablemente el mayor uso de la jalea real se encuentra en cosméticos, tal es así que a menudo es utilizada en preparados dermatológicos, principalmente en la regeneración de la piel para lograr efecto refrescante y rejuvenecedor (Figura 4). También se encuentra en la composición de cremas y ungüentos para curar las quemaduras y heridas. La cantidad de jalea real que suele incluirse en las cremas es muy baja, aproximadamente de 0,05 a 1% y, probablemente, en este tipo de preparados rápidamente pierde sus propiedades benéficas. En la preparación de las cremas, es muy utilizada la jalea real liofilizada, debido a la facilidad de su manejo (Murat y col., 2009).



Figura 4: Productos cosméticos con jalea real

Fuente: www.cosmeticos.name/wp-content/uploads/2010/02/elvive.jpg

4.6. Actividad antimicrobiana de jalea real

La presencia de propiedades antimicrobianas en la jalea real ha sido conocida durante muchos años. En la bibliografía existen diversos trabajos que evalúan la actividad antibacteriana de jalea real. En la mayoría de los trabajos se realiza purificación de péptidos y lípidos, estudiando en ellos su actividad antibacteriana (Stocker, 2003; Yatsunami y Echigo, 1985). Son pocos los trabajos que evalúan dicha actividad en muestras de jalea real completa. Melliou y Chinou (2005) estudiaron extractos metanólicos de jalea real y diferentes ácidos grasos aislados de la misma, observando fuerte actividad antibacteriana sobre diferentes bacterias Gram positivo y Gram negativo y también sobre levaduras. Existen estudios que mencionan la actividad antimicrobiana de la jalea real contra una variedad de microorganismos, incluyendo actinomicetes y ciertas especies de hongos y levaduras. El espectro antimicrobiano de la jalea real difiere significativamente del de las apidaecinas (proteína secretada en la hemolinfa de *Apis mellifera* L.) que es altamente activa contra bacterias Gram negativo (Bilikova y Simuth, 2001). También ha sido descrita la actividad fungicida de la jalea real sobre varios hongos, en particular, sobre especies de *Fusarium* (Sauerwald y col.,

1998). Además existen publicaciones que indican la actividad antiviral de la jalea real y una mayor resistencia a infecciones virales en ratones tratados con jalea real (Krell, 1996).

En nuestro laboratorio se han llevado a cabo estudios de actividad antibacteriana de muestras de jalea real de diferentes regiones ecológicas de Argentina. En ellos, se pudo observar que las muestras inhibieron el desarrollo de bacterias tanto Gram positivo como Gram negativo, algunas de ellas aisladas de infecciones superficiales en seres humanos y de mastitis en bovinos (García y col., 2010).

4.6.1. Proteínas y péptidos de jalea real con actividad antimicrobiana

Una gran parte de la jalea real corresponde a las proteínas, las que forman aproximadamente el 50% de su masa seca. Las principales proteínas de la jalea real corresponden a una gran familia de proteínas (MRJPs), denominadas actualmente “apalbúminas”, que implican el 90% del total de las proteínas con pesos moleculares de 49-87 kDa (Simuth y col., 2004). La parte minoritaria de las proteínas de la jalea real está compuesta por proteínas y péptidos con diferentes funciones, incluyendo propiedades antibacterianas y antifúngicas. El papel de las proteínas en la actividad antibacteriana de la jalea real fue descripto para bacterias y hongos (Sauerwald y col., 1998; Stocker, 2003; Fujiwara y col., 1990; Bilikova y Simuth, 2001; Bilikova y col., 2002). Fujiwara y col., en 1990, identificaron en la jalea real una proteína formada por 51 residuos de aminoácidos, con un peso molecular calculado de 5,5 kDa, denominada “royalisina”. La misma ejerce una potente actividad antibacteriana a bajas concentraciones. La royalisina posee un espectro antimicrobiano más estrecho con respecto a la jalea real nativa, inhibiendo la primera fuertemente sólo a bacterias Gram positivo tales como *Lactobacillus helveticus*, *Bifidobacterium adolescentes* y *Eubacterium aerofaciens*, entre otras. En contraste a la royalisina, la jalea real nativa también exhibió efectos inhibitorios sobre bacterias Gram negativo, tales como *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*. La royalisina podría estar involucrada en un sistema de defensa activo de las abejas melíferas contra la invasión bacteriana. Es posible que, conservada de una manera conveniente, la royalisina podría producir un efecto similar en seres humanos. Esta proteína pertenece a la familia de péptidos

antibacterianos de insectos, las defensinas, que son muy activos contra un amplio espectro de bacterias Gram positivo (Fontana y col., 2004; Bachanova y col., 2002).

Existe también en la jalea real, una familia de cuatro péptidos antimicrobianos: las “jelleinas”, que presentan un amplio espectro de actividad contra bacterias Gram positivo y Gram negativo, así como también sobre levaduras. Estos péptidos son activos contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans*. Las jelleinas y royalisina juntas, en virtud de su complementariedad, parecen ser parte de un sistema inmune permanente de la jalea real que provee a las abejas de un amplio espectro de protección antimicrobiano (Fontana y col., 2004).

4.6.2. Ácidos grasos de jalea real con actividad antimicrobiana

Una característica muy importante de la jalea real es su contenido de ácidos grasos, que han atraído mucho la atención de los investigadores debido a sus propiedades farmacológicas (Tani y col., 2009). Aunque los ácidos grasos de la mayoría de los animales y plantas poseen principalmente de 14 a 20 átomos de carbono, los de la jalea real son de cadena carbonada corta, de 8 a 10 átomos de carbono, son ácidos grasos libres y usualmente son hidroxí ácidos o ácidos dicarboxílicos. Estos ácidos grasos son los responsables de la mayoría de las propiedades biológicas asociadas a la jalea real (Antinelli y col., 2003).

El principal ácido graso presente en la fracción soluble en éter de la jalea real es el 10-HDA. La cantidad de este ácido graso en jalea real pura varía dependiendo del origen de la misma y de las características de la abeja (García-Amoedo y Almeida-Muradian, 2003). Aún no se ha informado otro producto natural que contenga 10-HDA como constituyente, por lo que se trataría de un lípido exclusivo de la jalea real. Incluso ningún otro producto de la colmena contiene éste ácido graso (Genc y Aslan, 1992; Plettner y col., 1996; Plettner y col., 1998). La concentración de 10-HDA puede considerarse como un parámetro de frescura y de calidad de los productos que contienen jalea real sirviendo para su control de calidad (Pamplona y col., 2004).

Blum y col., en 1959, mencionaron que el 10-HDA presente en la jalea real sería el componente responsable de la acción antibiótica. Con respecto a su espectro

antimicrobiano, se ha informado que inhibe el crecimiento de hongos y de bacterias Gram positivo tal como *S. aureus* y Gram negativo tales como *E. coli*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa* (Hornitzky, 1998; Isidorov y col., 2011; Melliou y Chinou, 2005). La diferencia que existe entre el espectro antimicrobiano de la royalisina y de la jalea real nativa, podría explicarse por la presencia en ésta última de sustancias tales como el 10-HDA, los que son completamente eliminados durante el fraccionamiento para la obtención de royalisina (Fujiwara y col., 1990).

Existen evidencias que muestran que la jalea real también es efectiva contra *Paenibacillus larvae* (Hornitzky, 1998), agente causal de una enfermedad grave que afecta a las larvas de abejas, denominada Loque Americana. Se ha propuesto que tanto el pH bajo de la jalea real como su contenido en 10-HDA son factores que pueden influir en la supervivencia de *P. larvae* (Schmidt y Buchmann, 1992).

El 10-HDA posee una variada acción farmacológica, incluyendo actividad antitumoral, promotor de la producción de colágeno y actividad antibiótica (Yang y col., 2010). Yatsunami y Echigo (1985) demostraron que la actividad antibacteriana sobre *B. subtilis* y *S. aureus* del 10-HDA resultó más fuerte que aquella correspondiente a otros ácidos grasos que también poseen 10 átomos de carbono en su estructura química.

Los ácidos grasos y sus correspondientes ésteres son un grupo de moléculas que se encuentran en la naturaleza y poseen baja o nula toxicidad. La actividad antibacteriana y antifúngica de los ácidos grasos, en particular los poliinsaturados, ha sido estudiada durante varios años. Se ha demostrado que los ácidos oleico y linolénico son bactericidas para un importante grupo de microorganismos patógenos incluyendo cepas de *S. aureus* resistentes a antibióticos (Sado-Kamdem y col., 2009). Se ha informado, además, que los ácidos grasos ejercen actividad antibacteriana sobre *Listeria sp.* y sobre microorganismos alteradores de alimentos. El modo de acción de los ácidos grasos aún no ha sido bien dilucidado, pero se piensa que la membrana citoplásmica sería su principal sitio de acción, ya que éstos ácidos afectarían la actividad respiratoria a través de la inhibición de enzimas involucradas en la captura de oxígeno (Nobmann y col., 2009).

4.6.2.1. El ácido 10-hidroxi-2-decenoico como parámetro de autenticidad de jalea real

Teniendo en cuenta las propiedades biológicas excepcionales que se le atribuyen, la jalea real posee un atractivo comercial considerable y, hoy en día, es utilizada en muchos sectores, que van desde la industria alimenticia a la farmacéutica y cosmética. Esto ha dado lugar, entre otras cosas, a la importación a gran escala en aquellos países donde la producción es insuficiente para satisfacer la demanda interna. Esto lleva a reforzar las investigaciones cualitativas y cuantitativas de los diferentes componentes y a la aplicación de los análisis efectuados sobre jalea real o sobre los productos, nuevos o tradicionales, que contienen jalea real en su composición y que se encuentran disponibles en el mercado (Sabatini y col., 2009).

No existen datos oficiales sobre el mercado de jalea real. Sin embargo, China es unánimemente reconocida como el líder productor mundial y exportador de este producto de la colmena, que se vende a precios muy competitivos. La producción china de jalea real se estima en 2.000 toneladas por año (una cantidad que representa más del 60% de la producción mundial), las cuales se exportan casi en su totalidad a Japón, el Reino Unido, Estados Unidos y Europa. Otros países, como Corea, Taiwán y Japón son importantes productores y exportadores. La jalea real también se produce, en menor medida, en Europa Oriental y, en menor cantidad, en Europa Occidental. En América, México es el principal productor de jalea real (Sabatini y col., 2009).

La adulteración de la jalea real es el problema más importante para el aseguramiento de su calidad y autenticidad. El criterio más importante a tener en cuenta para detectar adulteración en muestras de jalea real es la determinación del 10-HDA, debido a que es el único producto natural que posee este lípido, el cual puede utilizarse como un indicador de autenticidad. Sin embargo, los valores límites del contenido de 10-HDA en jalea real encontrados en la literatura son muy amplios, exigiéndose en general, un valor superior al 1,4% en muestras frescas y 3,5% en muestras liofilizadas (García-Amoedo y Almeida-Muradian, 2007; Sabatini y col., 2009). Antinelli y col. (2003) informan que el contenido de 10-HDA ha sido adoptado como un marcador de la jalea real y es comúnmente utilizado como una medida para evaluar el contenido de jalea real en otros productos de la colmena.

5. La apicultura en Argentina

El territorio argentino es muy apto para la apicultura: posee un clima templado, mucha oferta floral, no hay veranos con lluvias prolongadas, etc., por ello hay buenos colmenares desde Jujuy a Chubut. Argentina es uno de los principales países productores y exportadores de miel. También posee una reputación reconocida en la producción y calidad de jalea real. En este país la actividad apícola se ha incrementado notoriamente en los últimos años y se han implementado políticas tendientes a fortalecer el desarrollo del sector, tanto desde el punto de vista comercial como del científico-tecnológico asociado al mismo.

Una reseña del estado actual y la perspectiva de la apicultura argentina pueden explicarse en términos de la matriz FODA (Fortalezas, Oportunidades, Debilidades y Amenazas). Entre las *fortalezas* se incluyen el clima y la oferta vegetal, la calidad de las mieles, las instituciones dedicadas a la apicultura, los muy buenos especialistas y docentes y la capacidad de exportar la mayor parte de la producción. Entre las *oportunidades* se enumeran: incorporación de valor agregado, elaboración de productos orgánicos, polinización, incremento de la asociatividad, aprendizaje del comportamiento de las abejas, diversificación de la producción apícola y desarrollo de subproductos, exportación de productos agroindustriales con alto valor agregado, incorporación de nuevas tecnologías y fomento de la actividad apícola. Las *debilidades* incluyen la falta de valoración de las mieles que se exportan, el desaprovechamiento del mercado interno, la insuficiente difusión de los trabajos de investigación, la falta de unificación de criterios, la desconfianza en brindar estadísticas, el bajo grado de asociatividad operativa-comercial entre los apicultores, el incumplimiento de las normas y la mediana previsibilidad de resultados. Por último las *amenazas* incluyen que, frente al amplio crecimiento actual de la apicultura mundial, existiría una baja captación de estos mercados en expansión (Mendizábal, 2005).

La realización de un estudio sobre la jalea real producida en apiarios de diferentes regiones de Argentina, específicamente orientada hacia su actividad antibacteriana, contribuiría al conocimiento de uno de los principales productos apícolas. De acuerdo con la búsqueda bibliográfica llevada a cabo, hasta la fecha dichos estudios aún no se habrían realizado en nuestro país y podrían resultar de utilidad para

el diseño de nuevos medicamentos siendo particularmente importante este enfoque debido a la creciente resistencia microbiana a los antibióticos.

6. La apiterapia

Se define como el uso terapéutico y preventivo especialmente utilizando apitoxinas y también otros productos de la colmena, tales como la miel, el polen, la jalea real y el propóleo. Aunque se ha dicho que la apiterapia podría utilizarse para tratar una gran variedad de condiciones y enfermedades, su eficacia aún no está avalada por estudios clínicos rigurosos. Los creyentes en esta terapia, han sugerido una amplia variedad de padecimientos y enfermedades que podrían ser candidatas para ser tratadas con ella, siendo la más conocida la terapia del veneno de la abeja para las enfermedades autoinmunes y la esclerosis múltiple. Debido a las propiedades antimicrobianas de la jalea real, este producto natural podría ser ampliamente utilizado en apiterapia (Stocker, 2003; Yatsunami y Echigo, 1985).

7. Infecciones bacterianas superficiales de piel y de tejidos blandos

La piel es el órgano más grande del cuerpo humano o animal. Es vital en la homeostasis, ya que es el encargado de la interrelación e intercambio entre el medio interno y externo. Actúa como una barrera protectora contra la acción de agentes físicos, químicos o bacterianos, pudiendo aislar al organismo del medio que lo rodea, protegiendo y ayudando a mantener íntegras a sus estructuras. Está formada por dos tejidos que constituyen dos capas sucesivas que son muy diferentes: la epidermis, que es la capa más externa y cubre la capa de tejido conectivo, denominada dermis. Cada una de ellas tiene funciones y componentes diferentes que se interrelacionan para formar así lo que se denomina “la primera línea de defensa” (Santamaría González y Alvarado Delgadillo, 2002).

Ciertos factores están implicados en disminuir el crecimiento bacteriano a nivel cutáneo. Dentro de ellos se destacan: la sequedad, el pH bajo y las sustancias inhibitorias (compuestos bactericidas y bacteriostáticos) producidas por la piel. A pesar de esto, la piel presenta un conjunto de microorganismos que pueden convivir con el huésped como una flora o microbiota normal, sin causar ningún daño o enfermedad.

Por lo tanto, se pueden encontrar diversas especies bacterianas formando parte de la microbiota normal de la piel (Tabla 3). Las especies microbianas que colonizan la piel varían dependiendo del sitio del cuerpo en que se encuentren, el grado de humedad y otros factores, como el pH, la temperatura y la presencia de sebo, ácidos grasos y sal. En condiciones normales se encuentran entre 10^3 y 10^4 microorganismos por cm^2 , sin embargo, los recuentos pueden aumentar hasta 10^6 por cm^2 en las áreas húmedas del cuerpo, como las axilas y la ingle. La microbiota normal puede actuar como un inhibidor competitivo de microorganismos patógenos (Dryden, 2009).

Esta microbiota habitual se adquiere con rapidez durante y poco después del nacimiento y, a lo largo de la vida, cambia su composición en forma permanente. Tiene como función principal prevenir la colonización de otros microorganismos, potencialmente patógenos, gracias a la producción de factores con actividad antibacteriana (bacteriocinas, colicinas), así como productos de desecho metabólico que junto con la falta de oxígeno disponible impiden el establecimiento y colonización de otras especies de microorganismos (Santamaría González y Alvarado Delgadillo, 2002).

Tabla 3: Microbiota normal de piel

Bacterias Gram positivo	Bacterias Gram negativo
<p>Cocos: <i>Staphylococcus epidermidis</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Sarcina sp.</i> <i>Micrococcus sp.</i> <i>Streptococcus</i> α hemolíticos <i>Streptococcus</i> γ hemolíticos <i>Enterococcus sp.</i></p> <p>Bacilos: <i>Difteroides sp.</i> <i>Bacillus subtilis</i> <i>Propionobacterium sp.</i></p>	<p>Bacilos: Coliformes <i>Proteus sp.</i> <i>Acinetobacter sp.</i></p>

Las infecciones bacterianas de la piel y de los tejidos blandos son una de las presentaciones más comunes de los pacientes que concurren a los consultorios de urgencia de los hospitales. Las más comunes adquiridas en la comunidad incluyen celulitis, foliculitis, furunculosis e infecciones relacionadas con heridas, muchas de las

cuales pueden ser tratadas empíricamente con antibióticos orales, tales como las cefalosporinas, penicilinas resistentes a β -lactamasas o macrólidos. Algunas infecciones pueden ser clasificadas como complicadas y, a menudo, requieren hospitalización, especialmente en pacientes diabéticos o en aquellos casos en que se ha desarrollado bacteriemia. En muchos casos, los pacientes pueden sufrir infección grave fulminante como la fascitis necrotizante que está asociada con altas tasas de mortalidad. Para estos casos el tratamiento requiere de un diagnóstico inmediato y normalmente se realiza con antibióticos por vía intravenosa (Jones y col., 2003).

Diferentes bacterias son responsables de la contaminación y colonización de las heridas o de infecciones clínicas. Los microorganismos, como *S. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, entre otras, frecuentemente se aíslan de las heridas de la piel en los seres humanos y los animales (García y col., 2010).

Staphylococcus aureus es un coco Gram positivo inmóvil que frecuentemente coloniza las membranas nasales y la piel humana. Esta bacteria es responsable de la mayoría de las infecciones superficiales e invasivas de la piel (Han y col., 2009). Las infecciones más comunes causadas por esta bacteria son las que afectan al tejido cutáneo y subcutáneo (lesiones supuradas o abscesificadas), las infecciones de herida quirúrgica, bacteriemia, neumonía, osteomielitis, artritis y la infección asociada al catéter intravascular o sondaje urinario (Lowy, 2003). Existen cepas de *S. aureus* que presentan características particulares frente al antibiótico β -lactámico meticilina; clasificando a las cepas *S. aureus* como sensibles (SASM) o resistentes (SARM) a meticilina; estas últimas cepas son las principales bacterias Gram positivo involucradas en infecciones de piel y del tejido subyacente (Halcón y Milkus, 2004).

La mayoría de las infecciones causadas por *S. epidermidis* suelen ser adquiridas en el hospital, como resultado de la contaminación de un sitio quirúrgico por los microorganismos provenientes de la piel o nasofaringe del paciente o del personal del hospital (Vuong y Otto, 2002).

Los enterococos son uno de los principales patógenos intrahospitalarios. Aunque forman parte de la microbiota normal de la piel, del aparato genito-urinario o del tracto gastrointestinal de individuos sanos y no se les atribuye una elevada virulencia, en el ámbito hospitalario constituyen una de las causas más importantes de endocarditis,

bacteriemia, infecciones urinarias e infecciones de heridas. Las especies aisladas con mayor frecuencia son *E. faecalis* (80-90%) y *E. faecium* (5-10%) (Maciá y col., 2005).

Los pacientes que sufren de graves quemaduras poseen una gran interrupción de la barrera proporcionada por la piel, con una supresión simultánea del sistema inmunológico. Estas condiciones exponen a las heridas causadas por las quemaduras a la colonización bacteriana, lo que puede dar lugar a infección, sepsis, fallo multiorgánico y, posteriormente, la muerte. La infección bacteriana es la causa principal de muerte en pacientes con quemaduras graves y *P. aeruginosa* es el patógeno más frecuentemente aislado de las infecciones de heridas por quemaduras. Esto puede deberse principalmente a que se trata de un patógeno oportunista, cuyas necesidades nutricionales son mínimas, por lo tanto persiste en el ambiente durante períodos prolongados. Además, posee una alta resistencia intrínseca y adquirida a los antibióticos. Su hábitat hospitalario varía y está íntimamente ligado a ambientes húmedos (Barnea y col., 2009). La infección con *P. aeruginosa* es la complicación más seria en los pacientes con quemaduras seguida por las infecciones con *K. pneumoniae*, *E. coli*, *S. aureus* y otros microorganismos patógenos (Altöparlak y col., 2005; Nasser y col., 2003). Las infecciones por *Pseudomonas sp.* que son adquiridas en la comunidad oscilan entre 3-6 %, mientras que las intrahospitalarias se duplican, alcanzando una frecuencia del 12 % (Basualdo y col., 1996).

Existen estudios que indican la utilización tópica de plantas medicinales como agentes antimicrobianos y cicatrizantes de heridas de piel. La ventaja del uso de antimicrobianos tópicos es su habilidad para liberar altas concentraciones locales del antimicrobiano, independientemente del aporte vascular. Otras ventajas incluyen la ausencia de efectos sistémicos adversos, y una baja incidencia de resistencia (Ferreira de Oliveira y col., 2007). Estudios *in vitro* han demostrado buena actividad microbicida del aceite esencial del árbol del té sobre cepas de *S. aureus* causantes de infecciones de piel (Halcón y Milkus, 2004). Por otra parte, la miel ha sido utilizada desde la antigüedad para el tratamiento de algunas enfermedades respiratorias y para la cicatrización de heridas de piel. Se ha propuesto que el efecto cicatrizante de la miel puede deberse a varias de sus propiedades físicas y químicas, tales como su alta osmolaridad y acidez que contribuyen a su actividad antibacteriana (Basualdo y col., 2007).

8. Mastitis bovina

El término mastitis deriva de las palabras griegas “mastos”, que significa “pechos” e “itis” que quiere decir “inflamación de”. La inflamación es la respuesta de los tejidos productores de leche en la ubre a una lesión traumática, a irritaciones químicas o bien a la colonización de microorganismos infecciosos que han ingresado a la ubre (Alonso Gaona, 2006).

Entre las enfermedades más importantes que afectan al ganado bovino se encuentra la mastitis, patología reconocida mundialmente por causar grandes pérdidas económicas tanto al productor agropecuario como a la industria láctea. La mastitis bovina es una reacción inflamatoria de la glándula mamaria que produce alteraciones físicas y químicas en la leche, aumento del número de células somáticas por la presencia de microorganismos patógenos y, finalmente, cambios funcionales que causan pérdidas de productividad (Varella Coelho y col., 2007). Esta reacción inflamatoria ocurre como consecuencia de la respuesta de los tejidos a lesiones traumáticas, a sustancias irritantes o bien a la presencia de agentes infecciosos que han logrado colonizar el tejido secretor y que ejercen su acción sobre los tejidos mamarios en forma directa o indirecta por la acción citolítica de sus toxinas (Miller y Bartlett, 2004).

Es importante considerar que se trata de una enfermedad multifactorial, donde uno de los factores más importantes a tener en cuenta es la nutrición del animal, ya que una deficiencia en energía y proteínas, debida a una mala nutrición que ejerce un efecto directo sobre la salud de la ubre, debilitando sus mecanismos de defensa. Por lo tanto, esto podría causar que los microorganismos patógenos que normalmente habitan en el ambiente de la vaca infecten a la glándula mamaria. Otros factores, que intervienen favoreciendo la producción de la enfermedad, son el medio ambiente y el agente causal de la misma; aquí, el hombre juega un papel decisivo (Heinrichs y col., 2009).

La mastitis bovina es una enfermedad de distribución mundial y ha sido catalogada como la más costosa de todas las enfermedades que afectan al ganado lechero. Adicionalmente, la mastitis causa alteraciones en la composición láctea que tiene un impacto negativo en el rendimiento de la leche, en la calidad y en la vida útil de los productos derivados (Scaramelli y González, 2005). La producción lechera en Argentina tiene lugar principalmente en la región pampeana, abarcando las provincias

de Buenos Aires, Córdoba, Santa Fe, Entre Ríos y La Pampa, donde se encuentran las principales cuencas lecheras y, prácticamente, la totalidad de los tambos e industrias del sector (Calvinho y Tirante, 2005).

Se han identificado más de 80 especies causantes de mastitis bovina, que incluyen bacterias, hongos, micoplasmas y algas; más del 75 % de las mismas se deben a bacterias Gram positivo, particularmente especies de los géneros *Staphylococcus* y *Streptococcus* (Calderón y Rodríguez, 2008). Esta condición multitietológica y la ubicuidad en el ambiente de algunos de los microorganismos causantes de la enfermedad hace imposible la erradicación de la misma (Andresen, 2001).

El grado de infección puede variar mucho, desde presentaciones subclínicas hasta clínicas, en sus diversas formas, dependiendo de la severidad con la que la ubre reaccione frente a la fuente de irritación (Gunay y Gunay, 2008).

8.1. Patogénesis

La velocidad, el carácter y la intensidad de los síntomas clínicos así como la duración de la inflamación de la ubre están determinados por la patogenicidad y virulencia del agente causal, los mecanismos de defensa del huésped, el estado funcional de la glándula mamaria y la efectividad de un determinado tratamiento. Un agente patógeno sólo puede infectar a la ubre cuando existe una interacción de factores favorables. La infección de la glándula mamaria ocurre a través del conducto galactóforo del pezón a partir de dos fuentes principales de contaminación: la ubre infectada y el medio ambiente. La leche procedente de animales con infección en alguno de sus cuartos de la ubre puede diseminar con rapidez la infección a los pezones de otros animales sanos mediante la contaminación de las manos de los ordeñadores, los paños de lavado y/o las copas de los aparatos de ordeño (Radostits y col., 2002).

La entrada y penetración de una cepa patógena en la glándula mamaria se inicia a través del conducto galactóforo, de ahí pasa a la cisterna de la glándula y se dirige a los conductos lácteos para llegar a los espacios alveolares (etapa de invasión). Esa vía de infección galactógena es la más importante para casi todos los agentes patógenos de la mastitis. Luego de la invasión los microorganismos se multiplican rápidamente e invaden el tejido mamario; de este modo, dependiendo de la

patogenicidad del microorganismo, se establece una población que se disemina por toda la glándula. Consecuentemente, se produce la congestión capilar, edematización del tejido secretor y obstrucción de los conductos intralobulares. También ocurre una alteración a nivel capilar que produce cambios en la composición de la leche como por ejemplo disminución de la calidad y cantidad de caseína sintetizada, de la grasa butirosa y de la lactosa. Por otro lado, se produce un aumento de la concentración de sodio, de proteínas del suero sanguíneo, de enzimas y de células somáticas (etapa de infección) (Varella Coelho y col., 2007). Todo lo anterior deriva en una inflamación (mastitis) con un notablemente aumento del número de leucocitos en la leche ordeñada (Radostits, 2002); sin embargo, la magnitud del aumento en el recuento de células somáticas (RCS) varía de acuerdo con la bacteria involucrada en la infección de la glándula (etapa de inflamación) (Djabri y col., 2002).

8.2. Clasificación

La reacción inflamatoria es un mecanismo de protección que se produce para eliminar a los microorganismos patógenos, neutralizar sus toxinas o bien incentivar los mecanismos que participan en la reparación de los tejidos encargados de la producción de leche; de ese modo la glándula puede volver a funcionar normalmente. El grado de inflamación suele variar mucho, pudiendo tener desde diversas presentaciones clínicas hasta otras subclínicas; la severidad del cuadro dependerá del modo en el que la ubre reacciona frente a una determinada fuente de irritación (Alonso Gaona, 2006).

8.2.1. Mastitis clínica

En los países industrializados la mastitis clínica es la enfermedad más común y la que más pérdidas económicas causa a la producción láctea. Esta forma de infección intramamaria se caracteriza por presentar anormalidades visibles en la ubre y/o en la leche tales como la presencia de grumos, flóculos, sangre y/o secreciones serosas; la severidad varía mucho en el transcurso de la enfermedad. Pueden observarse cuartos enrojecidos o hinchados, o bien, palpase endurecidos y algunas veces con inflamación de los ganglios supramamarios (Almeida y col., 1996; Tollersrud y col., 2000). En

algunos casos, hay aumento de la temperatura rectal, letargo, anorexia e incluso la muerte. Además, las bacterias patógenas causantes de la mastitis están presentes en la leche, siendo el rendimiento de la misma muy reducido pues sus características nutritivas y organolépticas están considerablemente alteradas. La mastitis clínica generalmente es causada por estafilococos, estreptococos y coliformes (Heringstad y col., 2000). Según su grado de severidad, este tipo de mastitis puede ser clasificada, a su vez, en mastitis clínica subaguda, aguda o hiperaguda. Luego de la infección inicial la mastitis puede continuar con una presentación crónica debida a una infección de larga duración con leche alterada y cambios en la consistencia del tejido mamario debido a que parte del tejido glandular es reemplazado por tejido conectivo de cicatrización. (Djabri y col., 2002; Alonso Gaona, 2006).

8.2.2. Mastitis subclínica

Esta forma de mastitis es el tipo más frecuente de infección intramamaria y, tanto la ubre como la leche, tienen aspecto normal (Sandgren y col., 2008). La mastitis subclínica no es advertida a simple vista ni por el ordeñador ni por el productor, pero puede ser detectada por distintos tipos de análisis que manifiestan la presencia de microorganismos o un aumento en el recuento de células somáticas en la leche, como indicativo de la respuesta inflamatoria (Contreras y col., 2007). Causa importantes pérdidas económicas debido a que disminuye la producción afectando la calidad de la leche, lo que provoca pérdidas de bonificación por calidad. Comúnmente es de larga duración, difícil de detectar (debido a su naturaleza oculta) y difícil de tratar con los antibióticos. Además, los animales infectados pero aparentemente sanos pueden servir como reservorios contaminando el ambiente del tambo e infectando durante el ordeño a otros animales del rebaño lechero (Heringstad y col., 2000).

Es importante para los productores lecheros y sus asesores veterinarios enfocar su atención sobre el control de la mastitis subclínica debido a que es más prevalente que la mastitis clínica y, usualmente, la precede. Los agentes más frecuentemente asociados a esta infección subclínica son bacterias Gram positivo, entre las cuales predominan: *S. aureus*, *Staphylococcus coagulasa* negativos, *Streptococcus agalactiae* y *Streptococcus uberis*. (Almeida y col., 1996).

8.3. Patógenos de mastitis bovina

Los microorganismos causantes de mastitis viven en la vaca, en su ubre y en el medio ambiente del tambo y han sido clasificados en patógenos contagiosos, ambientales y oportunistas de acuerdo a sus características de distribución e interacción con el pezón y su conducto galactóforo (Calvinho, 2007; Miller y Bartlett, 2004).

8.3.1. Patógenos contagiosos

Se albergan en los cuartos mamarios de las vacas infectadas y constituyen la principal fuente de infección. Se transmiten de vaca en vaca generalmente durante el ordeño a través de las manos del ordeñador, los paños de secado y las pezoneras (Scaramelli y González, 2005). Los microorganismos de importancia en este grupo son:

♣ ***Staphylococcus aureus***: No es un patógeno obligado de la ubre, ya que se puede encontrar en lesiones de la piel de los pezones, en las manos de los ordeñadores y en las camas de las vacas (Calderón y Rodríguez, 2008). *S. aureus* es, a nivel mundial, el agente patógeno contagioso más importante asociado con la glándula mamaria que causa mastitis (Figura 5 A). La infección tiende a producir cicatrices, que resultan en sacos de infección encapsulados dentro de la ubre por lo que quedan aislados y son difíciles de alcanzar por los antibióticos (Gentilini y col., 1995; Russi y col., 2008).

♣ ***Streptococcus agalactiae***: Coloniza la ubre de la vaca y fuera de la glándula mamaria sólo sobrevive durante un corto período de tiempo. Se disemina principalmente durante el ordeño por medio de la máquina de ordeño, las manos contaminadas del operador y telas utilizados para lavar la ubre (Merl y col., 2003). (Figura 5 A y B).

♣ ***Mycoplasma bovis***: Es un patógeno poco común en los tambos, aunque ha sido aislado en Argentina. La mastitis causada por este agente aparece repentinamente, es extremadamente contagiosa y está caracterizada por signos clínicos severos. Los tratamientos no son de utilidad y los animales no desarrollan inmunidad, por lo que

todos los animales infectados deben ser aislados inmediatamente del rebaño (Cerdá y col., 2000).

8.3.2. Patógenos ambientales

El reservorio principal es el ambiente en el que viven las vacas. Estos microorganismos provienen del suelo, heces, camas de los animales, aguas contaminadas y del alimento, entre otras, y no dependen del momento del ordeño para ganar acceso al extremo del pezón (Phuektes y col., 2001; Scaramelli y González, 2005). Estos organismos constituyen un grupo heterogéneo de géneros y especies bacterianas, siendo las siguientes las más frecuentemente aisladas:

♣ ***Streptococcus uberis* y *Streptococcus dysgalactiae***: Se encuentran en las camas orgánicas (paja, aserrín, etc.), en aguas estancadas y tierra, así como también en la piel de la vaca (pezón y abdomen) y en los órganos reproductores (Guérin-Faubleé y col., 2002). Estos agentes no pueden ser eliminados del rebaño debido a que son parte normal del medio ambiente. Dentro de los estreptococos ambientales también existen otras especies que pueden causar mastitis, como por ejemplo *Streptococcus bovis* (Cruz y col., 2007).

♣ **Bacterias coliformes**: Son bacterias que habitan normalmente el intestino de las vacas, se multiplican en la materia fecal que se acumula en la cama del animal. Los coliformes pueden causar mastitis solamente si las partículas contaminadas procedentes del medio ambiente entran en contacto con los pezones de la ubre penetrando estas bacterias en forma ascendente a través de los conductos galactóforos. Entre las bacterias coliformes que producen mastitis, la especie patógena predominante es *E. coli* (Barkema y col., 1998; Schukken y col., 1989) (Figura 5 C). La infección causada por esta bacteria puede derivar en un cuadro clínico inflamatorio severo, que lleva a la eliminación de la bacteria dentro de las 96 horas iniciales de la infección (Paape y col., 2002) o bien a un resultado fatal para el animal que incluye choque anafiláctico, sepsis y, a menudo, la muerte (Burvenich y col., 2003; Burvenich y col., 2004).

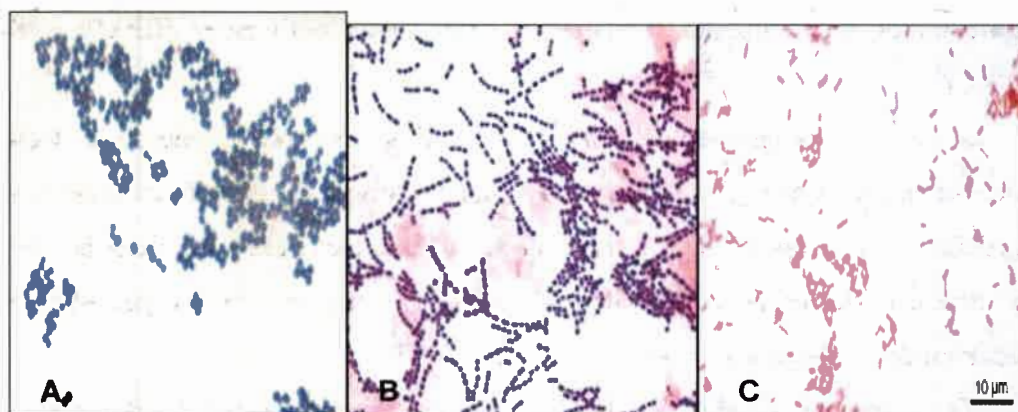


Figura 5: Coloración de Gram de algunas cepas bacterianas asociadas a infecciones intramamarias

Referencias: A: *Staphylococcus aureus*; B: *Streptococcus sp.*; C: *Escherichia coli*.

Fuente: www.wikipedia.org/wiki/Tinción_de_Gram.es

8.3.3. Patógenos oportunistas

La fuente más importante de infección es la piel de la vaca. La frecuencia de infección es mayor en el período de secado, durante el cual, la piel del pezón no está expuesta a los germicidas usados en la desinfección post-ordeño. Dentro de este grupo de patógenos se destacan los *Staphylococcus coagulasa* negativos (CNS). Las infecciones que causan suelen ser leves. Raramente generan casos clínicos y, si éstos aparecen, suelen ser moderados. Su presencia es muy común en la piel sana de los pezones y en las manos del ordeñador. La mayoría de las mastitis producidas por estos microorganismos se curan espontáneamente sin la necesidad de una terapia antimicrobiana.

8.4. Tratamiento

En nuestro país, donde la prevalencia de infección mastítica en los rebaños aún es elevada, se observa un predominio de los patógenos contagiosos. Estudios realizados en los últimos 10 años en distintas cuencas lecheras de Argentina muestran que, en general, los organismos más frecuentemente aislados, tanto de mastitis clínicas como subclínicas, son: *S. aureus* y distintas especies del género *Streptococcus*, hallándose

porcentajes relativamente menores de organismos coliformes (Rivelli y Rodríguez, 2001).

Existen programas de control de mastitis desarrollados desde la década del 60 que se basan en la higiene durante el ordeño, incluyendo desinfección de pezones post ordeño, terapias antibióticas durante el período de lactancia y al inicio del período seco y descarte de vacas con infección crónica. Estos programas permiten reducir la enfermedad a niveles aceptables (Calvinho, 2007).

Una vez aislado e identificado el agente causal puede procederse a la prueba de susceptibilidad a los antibióticos. Comúnmente, la mayoría de las drogas antimicrobianas usadas para los tratamientos clínicos son β -lactámicos, aminoglucósidos, macrólidos y lincosamidas (Rivelli y Rodríguez, 2001). La respuesta a estos antibióticos varía según el agente etiológico y la sensibilidad al mismo, encontrándose datos que varían según las distintas zonas de nuestro país (Calvinho y col., 1991).

La penicilina es el principal antibiótico utilizado para el tratamiento de mastitis bovina producida por bacterias Gram positivo (Ekman y col., 1994) y la principal resistencia a la misma por *S. aureus* es debida a la producción de β -lactamasas (Bengtsson y col., 2009). Sin embargo, el uso indiscriminado de estos fármacos a través de los años, ha inducido la selección de microorganismos patógenos multiresistentes, ocasionando, en algunos casos, fracaso terapéutico, que puede incluso causar la muerte del animal (Sandgren y col., 2008). Esto lleva a la búsqueda de nuevas alternativas para la lucha contra los microorganismos causantes de mastitis bovina y una alternativa al uso de antibióticos convencionales podría ser la utilización de diferentes sustancias de origen natural como, por ejemplo, la jalea real o sus componentes activos, tema de investigación del presente trabajo de Tesis Doctoral.

9. *Staphylococcus aureus* resistente a metilina

Staphylococcus sp. es una parte de la microbiota habitual de los seres humanos. *S. aureus* es la principal especie patógena del género y frecuentemente causa en los seres humanos diversas infecciones, tanto de origen comunitario como hospitalario. Causa infecciones de la piel y de tejidos blandos, entre muchas otras. Muchas de las

cepas de *S. aureus* han desarrollado resistencia a los agentes antibacterianos disponibles, creando un serio problema de salud pública. Los antibióticos β -lactámicos son las drogas de elección para el tratamiento de infecciones causadas por *S. aureus*. La resistencia a compuestos β -lactámicos hace referencia a meticilina, oxacilina, nafcilina, cloxacilina y dicloxacilina. Aunque el término resistencia a meticilina incluye resistencia a derivados β -lactámicos, las cepas bacterianas presentan, en general, resistencia múltiple a varios grupos de antibióticos. A través de diversos mecanismos presentan resistencia a cloranfenicol, tetraciclinas, macrólidos, lincosaminas, aminoglucósidos y quinolonas. Las infecciones causadas por cepas de SARM pueden ocasionar una amplia variedad de síntomas dependiendo del área del cuerpo afectada. Estas incluyen heridas de cirugía, quemaduras, sitios de inserción de catéter, ojos, piel y, a través de la sangre, pueden producir infecciones generalizadas o septicemia afectando diversos órganos y tejidos (Chomnawang y col., 2009; Lowy, 1998).

Aunque las infecciones causadas por SARM en los animales han surgido a un ritmo más lento con respecto a las ocasionadas en humanos, este patógeno ya es una importante preocupación en medicina veterinaria. Es extraña la escasez de informes referidos a infección del ganado vacuno por SAMR dado el papel considerable de *S. aureus* como patógeno de la especie bovina y el contacto cercano entre personas y el ganado lechero, considerando además, que el primer reporte de SAMR involucrado en mastitis bovina fue en el año 1972 (Devriese y col., 1972). Ha habido informes posteriores acerca de mastitis bovina causada por SARM, pero sin embargo la prevalencia de resistencia a la meticilina en los aislamientos de *S. aureus* de origen bovino parecería ser relativamente baja, quizás debido a que se han realizado pocos estudios en laboratorios de diagnóstico veterinario para determinar si las cepas provenientes de casos de mastitis bovina presentan o no resistencia a meticilina (Scott Weese y van Duijkeren, 2010).

10. Técnicas para evaluar la actividad antibacteriana de productos naturales

El primer propósito de estudiar la susceptibilidad antimicrobiana es guiar a los clínicos en la elección de agentes apropiados para la terapia. Además de estos trabajos

clínicos de rutina, los métodos de susceptibilidad antimicrobiana son usados para evaluar la actividad *in vitro* de nuevas sustancias.

En la última década ha habido un aumento del interés para estudiar la actividad antimicrobiana, particularmente pruebas de sensibilidad antibacteriana y antifúngica utilizando productos naturales. Esto se debe a una serie de factores que incluyen: poca disponibilidad de antimicrobianos que sean efectivos para el tratamiento de varias de las enfermedades infecciosas, aumento de la resistencia a los antibióticos y temor por el posible desarrollo de "superbacterias", las que podrían ser mucho más patógenas que las cepas actuales y podrían producir un serio aumento de las tasas de mortalidad y morbilidad (Valgas y col., 2007).

Existen numerosas recomendaciones publicadas en diversos textos, sean estos populares o no, que hacen referencia al uso de varios productos naturales aplicados en varias de las enfermedades infecciosas como, por ejemplo, aceites esenciales, miel, extractos de plantas, etc. Sin embargo, pocos productos han sido ampliamente evaluados por su actividad antimicrobiana. Una de las dificultades de los investigadores ha sido la ausencia de métodos simples y que además puedan ser validados y estandarizados; en general, los métodos que han sido utilizados para el estudio *in vitro* de la actividad antimicrobiana han sido adaptados de las técnicas descriptas para fármacos convencionales. Estos métodos poseen varias limitaciones pues, a diferencia de los fármacos convencionales, los productos naturales son mezclas complejas de compuestos que pueden o no actuar tal como se espera en una determinada prueba convencional. Estos constituyentes también pueden tener una solubilidad limitada en el medio acuoso, el cual es la base típica de muchos ensayos. Por otra parte, no existen métodos estandarizados para la extracción o destilación de productos; consecuentemente, la composición exacta del extracto que se está probando puede ser desconocida para algunos investigadores que no tienen acceso al financiamiento o al equipamiento para realizar cromatografía gaseosa con detector de espectrometría de masas (GC-MS) u otros análisis químicos de los extractos que se deben evaluar. Existen numerosos y diferentes métodos utilizados para evaluar la actividad antimicrobiana de productos naturales, sin embargo, hasta el presente no hay ningún método estandarizado que pudiera ser ampliamente utilizado por todos los investigadores y frente a la

diversidad de técnicas no existe un estudio que determine cuál de todos los métodos disponibles podría ser el mejor para realizar los ensayos *in vitro* (Wilkinson, 2006).

Debido a que no todos los métodos utilizados en el estudio de actividad antibacteriana se basan en los mismos principios, los resultados obtenidos estarán profundamente influenciados por el método que sea seleccionado. Además, debe tenerse en cuenta que existe una gran diversidad de cepas de cada microorganismo y su selección condicionará los resultados a obtener. Finalmente, debe considerarse que el grado de solubilidad de cada compuesto que se evalúa puede alterar los resultados (Valgas y col., 2007).

La susceptibilidad antimicrobiana puede ser evaluada cualitativamente, según el “National Committee for Clinical Laboratory Standards” (NCCLS), como *susceptible*, cuando el microorganismo debe responder a las dosis habituales del agente antimicrobiano administrado por una vía adecuada, incluida la vía oral; *intermedia*, que implica que el microorganismo puede ser inhibido por las concentraciones de fármaco que se alcanzan cuando se administran las dosis máximas por vía parenteral o *resistente*, cuando el microorganismo no es inhibido por ninguna de las concentraciones *in vivo* alcanzables por el fármaco y que, por lo tanto, no debe ser elegido para el tratamiento. También puede evaluarse cuantitativamente *in vitro* en términos de la mínima concentración de los agentes que inhiben el crecimiento del microorganismo (o concentración inhibitoria mínima) (CIM) o aquella mínima concentración que lo mata, la concentración bactericida mínima (CBM) (Collins y col., 1995; Koneman, 1999).

Las técnicas disponibles para la detección de actividad antibacteriana de productos naturales, generalmente se clasifican en: técnica de difusión, de dilución y de bioautografía (Valgas y col., 2007).

10.1. Técnicas de difusión en agar en discos de papel y en pozo

El método de difusión en agar según el método de Kirby-Bauer (1966) consiste en aplicar sobre la superficie de una placa de agar sembrada con el microorganismo, cuya sensibilidad se quiere estudiar, un disco que contiene una cantidad específica del antimicrobiano. El mismo, difunde desde el disco al agar y, si es activo contra el germen, producirá un halo de inhibición cuyo diámetro estará directamente

correlacionado con la concentración y efectividad del principio activo del antimicrobiano en estudio.

De manera similar, la técnica de difusión en pozo consiste en realizar orificios sobre una placa de agar sembrada con el microorganismo, cuya sensibilidad se quiere estudiar, colocando en los mismos diferentes cantidad específicas del antimicrobiano. El mismo, difunde desde el pozo hacia el agar y, si es activo contra el germen, producirá un halo de inhibición.

Ambas técnicas de difusión en agar son las más ampliamente empleadas para medir actividad antimicrobiana. Son reconocidas como métodos precisos y confiables. Sin embargo, todavía persiste un cierto desacuerdo entre los científicos: algunos de ellos la consideran como técnicas semi-cuantitativas, mientras que otros argumentan que son sólo técnicas cualitativas, dando sólo una idea de la presencia o ausencia de actividad antimicrobiana en la sustancia estudiada, argumentando además, que los resultados no son siempre reproducibles (Valgas y col., 2007). Este último punto parece meritorio dado la dificultad de los compuestos hidrofóbicos para difundir en el agar. Sin embargo, las técnicas de difusión en agar son fáciles de implementar y proporcionan una estimación de la inhibición del crecimiento bacteriano (Wilkinson, 2006; Kalemba y Kunica, 2003). La difusión de la sustancia antimicrobiana está afectada por el espesor del agar, debido a que la misma se produce en las tres dimensiones (Koneman, 1999). Estos métodos no deberían utilizarse para la comparación de muestras con diferentes hidro-solubilidades (Sawaya y col., 2004).

Valgas y col. (2007), observaron una mejor sensibilidad en la técnica de difusión en pozo comparada con la de disco al evaluar la actividad antibacteriana de extractos de productos naturales. En la técnica de difusión en pozo, la muestra evaluada es mucho menos probable que interfiera con la difusión de la sustancia antimicrobiana en el agar que en la técnica de difusión en disco. La precipitación de sustancias insolubles en agua en el disco evita la difusión de sustancias antimicrobianas en el agar.

10.2. Técnicas de dilución en caldo y en agar

La técnica de dilución en caldo, realizada en tubos de ensayo (técnica de macrodilución en caldo) o en policubetas de 96 pocillos (técnica de microdilución en

caldo), es considerada precisa para evaluar la susceptibilidad de un microorganismo frente al compuesto antibacteriano que se está probando. Es ampliamente utilizada dado que una de sus ventajas es que permite obtener resultados cuantitativos entre los que se incluyen la determinación de CIM y, a posteriori, de CBM (Finegold y Baron, 1992). Además, las pruebas de dilución pueden ser aplicadas a un intervalo más amplio de aislamientos que las pruebas de difusión (Koneman, 1999).

La técnica de microdilución en caldo tiene como ventaja la utilización de pequeños volúmenes de reactivos y así pueden probarse muchos más microorganismos con menor costo y mayor rapidez (Koneman, 1999). Esta técnica es útil para la determinación de CIM de un gran número de muestras pues se requieren pequeñas cantidades, lo cual es muy importante en el caso en que el antimicrobiano en estudio sea escaso o difícil de obtener en su etapa experimental, tal como ocurre con muchos productos naturales. Es una técnica económica y presenta resultados reproducibles (Devienne y Raddi, 2002). La utilización de esta técnica es adecuada para la determinación de CIM en sustancias puras (Valgas y col., 2007). La técnica de microdilución en caldo es treinta veces más sensible que otros métodos utilizados en la determinación de la actividad antimicrobiana de los extractos de plantas (Ferreira de Oliveira y col., 2007).

En la técnica de dilución en agar la sustancia evaluada se diluye como se ha descrito anteriormente, pero luego cada una de las diluciones se incorpora al agar antes que éste solidifique; de este modo el microorganismo se siembra sobre la superficie de una serie de placas de agar que contienen diferentes concentraciones conocidas del producto a probar. Una desventaja comparativa importante de esta técnica es el uso de mayores volúmenes de la sustancia que se está evaluando (Wilkinson, 2006).

10.3. Técnica de bioautografía

La bioautografía se utilizó por primera vez en el año 1946 para estimar la pureza de la penicilina (Goodall y Levi, 1946). Es una técnica utilizada para detectar sustancias que afectan la velocidad de crecimiento de los microorganismos pero que están incorporadas dentro de una mezcla compleja. Es un método de detección rápida o “screening” que sólo da idea de la presencia o ausencia de sustancias con actividad

antimicrobiana en productos naturales. Por lo tanto, es considerada una técnica cualitativa. Uno de los campos de aplicación de la bioautografía es la investigación de antibióticos y de otros compuestos biológicamente activos en agua, fluidos corporales, alimentos, etc. La técnica de bioautografía se divide en tres categorías (Valgas y col., 2007):

♣ **Bioautografía por contacto:** los componentes antimicrobianos de la muestra en estudio difunden desde el cromatograma, realizado por medio de una cromatografía en capa delgada (CCD) en sílica gel, hacia el agar previamente inoculado con un microorganismo determinado. El cromatograma se coloca cara hacia abajo sobre una capa de agar inoculado y se deja en esas condiciones por algún tiempo para permitir la difusión. A continuación, se retira el cromatograma y se incuba la placa de agar. Las zonas de inhibición del crecimiento microbiano se observan sobre la superficie del agar en aquellos lugares donde previamente difundió el componente antimicrobiano. Una desventaja es la dificultad de obtener contacto completo entre el agar y el cromatograma y la adherencia del adsorbente a la superficie del agar.

♣ **Bioautografía directa:** el cromatograma desarrollado es sumergido en una suspensión microbiana realizada en un caldo o ésta es aplicada como un “spray” sobre el mismo. Posteriormente, el cromatograma se incuba y el microorganismo crece directamente sobre él, visualizándose las zonas de inhibición del crecimiento microbiano.

♣ **Bioautografía indirecta o de inmersión:** el cromatograma desarrollado es cubierto con un medio agarizado y previamente inoculado. Luego de la solidificación e incubación, se visualizan las zonas de inhibición del crecimiento microbiano. Esta técnica es un híbrido entre la bioautografía por contacto y la directa. Los compuestos antimicrobianos son transferidos desde el cromatograma hacia la capa de agar, pero durante la incubación el agar permanece sobre él. La principal desventaja de este método es la baja sensibilidad causada por la dilución del compuesto antimicrobiano en el agar.

Para localizar y visualizar el desarrollo microbiano en la bioautografía se utilizan como indicador del crecimiento bacteriano sales de tetrazolium como, por ejemplo, una solución del colorante vital cloruro de 2,3,5 - trifenil tetrazolio (TTC). Esta sal de tetrazolium incolora y soluble en su estado oxidado es utilizada frecuentemente para medir actividad respiratoria asociada a cadenas de transporte de electrones, dada la rapidez con que son reducidas por la mayoría de los sistemas de deshidrogenadas de los microorganismos vivos. La reducción de una sal de tetrazolium causa la formación de un precipitado insoluble de coloración intensa, conocido con el nombre de formazán, que es una sal de pigmentación rojiza e insoluble en su estado reducido. La visualización se fundamenta en la capacidad que tienen los microorganismos vivos de reducir la sal de tetrazolium. La ausencia de color indica inhibición del crecimiento bacteriano (estado oxidado) y el rosado presencia de crecimiento (estado reducido) (Weins y Jork, 1996).

La bioautografía puede ser empleada como una herramienta útil para lograr la purificación de sustancias antimicrobianas pues permite una fácil localización de la actividad incluso en matrices complejas como las derivadas de los productos naturales. La comparación de los bioautogramas desarrollados bajo condiciones idénticas y visualizados con un reactivo cromogénico adecuado puede proveer información útil acerca de la naturaleza de los compuestos activos (Valgas y col., 2007). Una gran ventaja de la bioautografía es que el fraccionamiento de la muestra (extractos, aceites esenciales, etc.) y la determinación de la bioactividad se realizan de manera simultánea (Wilkinson, 2006). Debido a que se trata de una técnica visual, la bioactividad de los compuestos sobre las placas puede ser fácilmente interpretada (Gende y col., 2008).

La bioautografía puede ser combinada con otras técnicas cromatográficas como, por ejemplo, cromatografía en columna, cromatografía gaseosa (GC) o cromatografía líquida (LC). A partir de la cromatografía en columna se colectan diferentes fracciones, para luego ser evaluadas por bioautografía o estudiadas mediante GC o LC (Islam y col., 2003).

Por esto, en el presente estudio fue necesario, a fin de realizar análisis comparativos, ensayar diferentes técnicas para evaluar la actividad antibacteriana de la jalea real. En primer lugar, se realizó el método de difusión en agar en discos y en pozos a los efectos de evaluar de manera semi-cuantitativa la susceptibilidad de las bacterias

estudiadas a las diferentes muestras de jalea real y estimar el grado de inhibición de su crecimiento. Además, se realizó el método de macrodilución y microdilución en caldos con el objeto de obtener resultados cuantitativos. Se realizó un estudio de la actividad antibacteriana de extractos lipídicos y desgrasados de jalea real por técnica de difusión en pozo a fin de determinar cuál de ellos posee actividad antibacteriana sobre las cepas bacterianas en estudio. A continuación, se estudió la actividad antibacteriana de las diferentes fracciones del extracto lipídico utilizando como metodología la bioautografía. Posteriormente, por la técnica de microdilución en caldo, se obtuvo la CIM de la fracción activa del extracto lipídico de jalea real.

En este trabajo se estudió la actividad antibacteriana de jalea real sobre bacterias aisladas de infecciones superficiales en humanos y de mastitis bovina, con la finalidad de ampliar el espectro de actividad antibacteriana de este producto de la colmena. Existen otros estudios que evalúan actividad antibacteriana de jalea real sobre microorganismos aislados de diversos orígenes, tales como *S. aureus*, *S. saprophyticus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *C. albicans* (Fontana y col., 2004), *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus*, *Shigella flexneri* y *Salmonella typhi* (Ratanavalachai y Wongchai, 2002) así como también cepas de *Streptomyces sp.* (Eshraghi, 2005), pero hasta el momento no se han encontrado en la bibliografía disponible estudios realizados sobre bacterias causantes de infecciones superficiales en humanos y de mastitis bovina. A fin de realizar estudios comparativos, se llevaron adelante ensayos sobre bacterias aisladas de diversos orígenes (agua de pozo y compostaje de aves) así como también sobre cepas de referencia.

11. Obtención de extractos lipídicos y desgrasados (proteicos) a partir de productos naturales

Tal como se explicó anteriormente, la jalea real virgen esta compuesta principalmente por agua, azúcares, proteínas, lípidos, minerales y vitaminas (Código Alimentario Argentino, 2010b). La literatura cita diversos trabajos que evidencian la actividad antibacteriana del ácido graso exclusivo de jalea real, el 10-HDA presente en la fracción lipídica, así como también de proteínas tales como la royalisina y las jelleinas en la fracción desgrasada. De acuerdo a dichas evidencias, en el presente

trabajo fue necesario obtener el extracto lipídico y el extracto desgrasado (formado, principalmente, por proteínas) con la finalidad de evaluar la actividad antibacteriana de los mismos y continuar posteriormente con la profundización del estudio del extracto activo.

Generalmente, la literatura describe a los lípidos como un grupo de compuestos altamente solubles en solventes orgánicos. Sin embargo, una definición de éste tipo es un poco engañosa, debido a que existen lípidos que se caracterizan por tener, en la misma molécula, una zona polar, que interacciona fácilmente con el agua, y una zona hidrofóbica, de la cual el agua, y otros compuestos polares, quedan excluidos. Las moléculas que poseen esta característica se denominan anfipáticas. Por lo tanto, los lípidos pueden ser definidos como pequeñas moléculas hidrofóbicas o anfipáticas.

Además de ser fundamentales en mantener la integridad de la estructura de la membrana celular de tejidos animales y vegetales, formando una bicapa lipídica compuesta por fosfolípidos, los lípidos también son la principal forma de almacenamiento de energía (como los triglicéridos de las células de mamíferos) y proveen de un medio ambiente hidrofóbico apropiado para el funcionamiento y las interacciones de las proteínas de membrana.

Debido a que los lípidos normalmente aparecen en su forma libre, pero embebidos en una matriz, es necesario realizar la extracción antes de llevar a cabo los análisis. Los componentes obtenidos en el extracto lipídico dependen del método de extracción utilizado, especialmente del solvente. Los solventes no polares como, por ejemplo, hexano, éter de petróleo, etc. pueden ser adoptados para realizar la extracción de lípidos neutros simples (ésteres de ácidos grasos y acilglicerol). Los lípidos más complejos y más polares (fosfolípidos, lipoproteínas, glicolípidos y ácidos grasos libres) requieren de solventes más polares como éter etílico, metanol o acetonitrilo. El método más ampliamente utilizado para la extracción de lípidos a partir de muestras sólidas es la extracción Soxhlet, el cual es reconocido por la AOAC (Asociación Oficial de Químicos Analíticos) como un método estándar internacional (AOAC, 1990; Carrasco-Pancorbo y col., 2009). La fracción lipídica de la jalea real está primariamente compuesta por componentes polares (que son extraídos con éter etílico) y sólo por una pequeña fracción que es soluble en hexano (Lercker y col., 1981). La obtención de lípidos por medio de la extracción Soxhlet permite, indirectamente, la obtención de la

fracción desgrasada en el cartucho. Esta fracción está formada principalmente por proteínas, azúcares, vitaminas y minerales.

Un gran número de métodos pueden ser utilizados para evaluar la calidad y las características químicas de los lípidos en los alimentos. Las técnicas cromatográficas son muy útiles para la identificación de diferentes componentes de la muestra. La cromatografía fue una de las primeras técnicas de separación utilizadas para evaluar lípidos que aún sigue en vigencia. La separación e identificación de grupos de lípidos utilizando CCP en sílica gel permite un “screening” rápido en un gran número de muestras, otorgando información útil y permitiendo la separación de una mezcla de lípidos con diferentes polaridades. En casos más complicados, cuando la identificación no es confiable, las bandas sospechosas son aisladas de las placas y analizadas en detalle por medio de métodos apropiados como, por ejemplo, técnicas espectroscópicas (Carrasco-Pancorbo y col., 2009; Momchilova y Nikolova-Damyanova, 2008).

Tradicionalmente los lípidos han sido analizados utilizando GC con detector de ionización de llamas (FID). La GC puede ser limitada debido a que los compuestos analizados deben ser térmicamente estables y con una presión de vapor lo suficientemente alta para volatilizarse durante la inyección. La derivatización puede resolver el problema en términos de volatilidad en moléculas químicamente simples. La composición de ácidos grasos es normalmente estudiada por la inyección en GC de los correspondientes ésteres metílicos de los ácidos grasos (FAME) obtenidos tras realizar la derivatización. Para la identificación definitiva de los FAME, es indispensable, en lo posible, comparar el tiempo de retención de los estándares con los obtenidos a partir de las muestras (Carrasco-Pancorbo y col., 2009; Park y col., 2001).

Si bien existen estudios que evalúan la actividad antibacteriana de jalea real sobre microorganismos aislados de diversos orígenes, tales como *S. aureus*, *S. saprophyticus*, *B. subtilis*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* y *C. albicans* (Fontana y col., 2004), *M. luteus*, *B. cereus*, *S. flexneri* y *S. typhi* (Ratanavalachai y Wongchai, 2002) así como también cepas de *Streptomyces sp.* (Eshraghi, 2005), hasta el momento no se ha descrito en la literatura el uso de la jalea real para el tratamiento de microorganismos que causan frecuentemente infecciones superficiales en seres humanos y mastitis en bovinos. Esto llevó a la realización del presente trabajo de Tesis Doctoral, estudiando la actividad antibacteriana de la jalea real sobre bacterias aisladas

de infecciones superficiales de la piel en el hombre y de ubres afectadas por mastitis en bovinos. En un principio se trabajó con muestras de jalea real completa, procedentes de diferentes regiones de la República Argentina. Luego se continuó con la investigación de los extractos desgrasados (proteicos) y los extractos lipídicos y, por último, se profundizó el estudio analizando la fracción lipídica con el objetivo de conocer los componentes activos. Además, con fines comparativos, se incluyeron cepas bacterianas que fueron aisladas de diversos orígenes.

HIPÓTESIS

La jalea real de diversas regiones de Argentina posee actividad antibacteriana contra microorganismos comúnmente encontrados en infecciones superficiales de seres humanos y animales.

OBJETIVOS

1. Objetivo General

Determinar, a mediano plazo, la actividad antibacteriana *in vitro* de muestras de jalea real obtenidas de colmenas de apiarios de diversas regiones de Argentina. A largo plazo se pretende caracterizar los componentes activos en dichas muestras y su actividad antibacteriana contra agentes de infecciones superficiales en seres humanos y de mastitis en bovinos.

2. Objetivos Específicos

- a) Determinar la pureza y autenticidad de las muestras de jalea real mediante la determinación de sus características fisicoquímicas.
- b) Caracterizar las muestras de jalea real y sus extractos lipídicos y desgrasados por su actividad contra bacterias Gram positivo y Gram negativo, aisladas de infecciones superficiales en seres humanos.
- c) Caracterizar las muestras de jalea real y sus extractos lipídicos y desgrasados por su actividad contra bacterias Gram positivo y Gram negativo, aisladas de mastitis en bovinos.
- d) Caracterizar la composición lipídica de las muestras de jalea real por cromatografía en capa fina.
- e) Obtener la fracción con actividad antibacteriana presente en el extracto lipídico de una muestra de jalea real.
- f) Evaluar la actividad antibacteriana de la fracción lipídica activa de una muestra de jalea real.
- g) Identificar químicamente los metabolitos con acción antibacteriana presentes en la fracción lipídica de una muestra de jalea real mediante estudios de cromatografía gaseosa con detección de ionización de llamas.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Muestras de jalea real

En el presente trabajo de Tesis se utilizaron las siguientes muestras de jalea real:

a) Jalea real Regional (JR R): Esta muestra fue obtenida de un comercio del ramo y proveniente de colmenas de apiarios del sur de la Provincia de Córdoba. Esta muestra se utilizó para poner a punto diferentes ensayos de actividad antibacteriana para luego realizar los ensayos comparativos con el resto de las muestras.

b) Jalea real Norte Grande (JR NG): Esta muestra fue provista por la Estación Experimental Agropecuaria INTA Famaillá (Provincia de Tucumán), obtenida de colmenas de apiarios en los que no se utilizaron antibióticos y supervisadas por el Programa Apícola (PROAPI). Esta fue utilizada como muestra de referencia para los diferentes ensayos realizados.

c) Jalea real Corrilobo (JR C): Esta muestra proviene de un apiario de Corrilobo (Provincia de Córdoba) y como se obtuvo en mayor cantidad que las demás muestras fue utilizada para la realización de todos los ensayos.

d) Jalea real La Pampa (JR LP): Esta muestra proviene de un apiario de la Provincia de La Pampa y sólo se utilizó de manera comparativa en algunos de los ensayos debido a que fue conseguida poca cantidad de la misma.

Los proveedores de las muestras JR R, JR C y JR LP aseguraron que las mismas fueron obtenidas a partir de colmenas sin aplicación de antibióticos.

2. Caracterización fisicoquímica de las muestras de jalea real

Con la finalidad de determinar la pureza de las muestras de jalea real, se realizaron análisis fisicoquímicos según las exigencias para jalea real virgen no liofilizada establecidas por el CAA, las cuales se resumen en la Tabla 2 (Código Alimentario Argentino, 2010b).

Los ensayos fueron realizados por duplicado y se detallan a continuación.

2.1. Determinación de humedad

El contenido de humedad de las muestras de jalea real se realizó mediante secado de las mismas en estufa a 70 °C hasta la obtención de un peso constante del residuo seco, lo cual se logró en aproximadamente unas 12 h. Este ensayo fue realizado en cápsulas de porcelana expuestas, previamente, a la temperatura de secado de las muestras durante 15 min y luego pesadas.

2.2. Determinación de pH

El pH de las muestras de jalea real se obtuvo a partir de una solución al 5 % p/v de las mismas en agua destilada y a 20 °C, utilizando un peachímetro Orion 720A (USA).

2.3. Determinación del índice de acidez

Este ensayo se realizó mediante la titulación de las muestras de jalea real utilizando una solución de KOH 0,086 N, previamente estandarizada con biftalato de potasio y fenolftaleína al 1 % como indicador. El índice de acidez se expresó en mg KOH/g de jalea real, que corresponden a los miligramos de KOH necesarios para neutralizar los ácidos contenidos en 1 g de jalea real.

2.4. Determinación de proteínas totales

El contenido de proteínas totales de las muestras de jalea real se realizó mediante el método Kjeldahl, realizando las correspondientes digestiones, destilaciones y titulaciones como lo indica el método 954.01 de la AOAC. El contenido de proteínas se expresó como nitrógeno total utilizando el factor promedio de nitrógeno en las proteínas de 6,25 (AOAC, 1990).

2.5. Determinación de lípidos totales

Para determinar el contenido lipídico de las muestras de jalea real se realizó la técnica de extracción continua de los lípidos, durante 3 h utilizando un extractor Soxhlet. Para ello, se utilizaron los extractos secos de las muestras de jalea real obtenidos luego del secado de las mismas, a 70 °C durante 12 h, al realizar la determinación de humedad.

Dado que en la bibliografía (método 920.75 de la AOAC) no se especifica el solvente a utilizar en la extracción, la técnica se ensayó repetidamente, utilizando diversos solventes, tales como éter de petróleo, metanol y éter etílico a fin de dilucidar cual es el solvente más adecuado de extracción de lípidos en muestras de jalea real (AOAC, 1990).

Finalmente, los ensayos se repitieron utilizando éter etílico, dado que la recuperación de lípidos con dicho solvente se correspondió aproximadamente con los valores del intervalo de contenido lipídico exigido por el CAA, no siendo así cuando se utilizó metanol y éter de petróleo como solventes. Una vez realizada la extracción de los lípidos, se procedió a destilar el éter etílico contenido en los balones, los que posteriormente se colocaron en baño de agua a 45 °C y con corriente de N₂ a fin de evaporar el solvente. Por último, se colocaron los balones en desecador durante toda la noche y se pesó el residuo graso contenido en ellos. El proceso de secado se realizó hasta obtener peso constante. La determinación se llevó a cabo siguiendo el método 920.75 de la AOAC (AOAC, 1990).

2.6. Determinación de cenizas

A fin de obtener el contenido de cenizas en las muestras de jalea real estudiadas, primeramente, se llevó a cabo la carbonización de las mismas en cápsulas de porcelana, previamente pesadas, por exposición al calor directo de un mechero Bunsen. Posteriormente, las muestras carbonizadas se colocaron en mufla a 500 °C durante 2 h aproximadamente y hasta obtener un peso constante, a fin de realizar la calcinación de las mismas.

2.7. Análisis de carbohidratos

La caracterización de la composición de carbohidratos en las muestras de jalea real se realizó mediante la determinación del porcentaje de glucosa y fructosa (azúcares reductores) así como también de sacarosa mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) con detector electroquímico.

Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: se utilizó una columna de intercambio aniónico Hamilton RCX-10 de 250 x 4,1 mm; con un tamaño de partícula de 7 μm ; detector electroquímico amperométrico con electrodo de trabajo NiCr (80:20). El potencial del electrodo de trabajo fue de 0,5 V (vs. electrodo de calomel saturado). Se trabajó en condiciones isocráticas utilizando NaOH 0,1 N como fase móvil a una velocidad de flujo de 0,5 mL/min y se trabajó a una sensibilidad de 1 $\mu\text{A/V}$, con un volumen de inyección de 20 μL .

Las muestras de jalea real se pre-trataron, previo a su inyección, en el cromatógrafo. Para ello, aproximadamente 0,12 g de las mismas fueron resuspendidas en agua tridestilada, luego se microfiltraron y la fracción soluble se utilizó en el análisis de carbohidratos.

Se utilizaron soluciones patrones de glucosa, fructosa y sacarosa a una concentración de $1,0 \times 10^{-4}$ M. Los análisis se realizaron por triplicado.

Todos los reactivos, las soluciones y los solventes utilizados se detallan en el Anexo I.

3. Preparación de diluciones de jalea real utilizadas en los ensayos de actividad antibacteriana

Se realizaron diluciones de las muestras de jalea real utilizando agua destilada estéril como diluyente y se obtuvieron las concentraciones expresadas como porcentaje del peso de la jalea real/peso del agua (% p/p), considerando la densidad del agua es de 1,0 g/mL (Tabla 4).

Tabla 4: Preparación de las diluciones de jalea real

Concentración de jalea real (% p/p)	Masa de jalea real (g)	Masa de agua (g)*
100 (Jalea Real sin diluir)	1	0
90	0,9	0,1
80	0,8	0,2
70	0,7	0,3
60	0,6	0,4
50	0,5	0,5
40	0,4	0,6
30	0,3	0,7
20	0,2	0,8
0 (Control negativo)	0	1

Nota: *: Densidad del agua destilada utilizada como diluyente: 1,0 g/mL

4. Obtención de extractos lipídicos y extractos desgrasados de jalea real

4.1. Liofilización de muestras de jalea real

Con la finalidad de eliminar el contenido acuoso de las muestras de jalea real se procedió a realizar la liofilización de las mismas. Esta metodología se llevó a cabo a fin de preservar el deterioro y evitar posibles oxidaciones de los lípidos, que podrían ocurrir si las muestras fueran expuestas a desecación mediante la metodología convencional requerida por el CAA: secado a 70 °C durante 12 h. De esta manera, se preservó la composición química de los extractos de las muestras JR NG, JR C y JR LP que, posteriormente, fueron sometidos a estudios de actividad antibacteriana. La muestra JR R sólo se utilizó para poner a punto la liofilización.

4.2. Técnica de extracción continua de lípidos utilizando un extractor Soxhlet

Las muestras de jalea real liofilizadas se colocaron en cartuchos de papel y se sometieron a la técnica de extracción continua durante 3 h, utilizando un extractor Soxhlet (Figura 6) con la finalidad de obtener los lípidos de las mismas (AOAC, 1990). La fracción lipídica de la jalea real está compuesta primariamente de componentes polares (que son extraídos con éter etílico) y sólo una pequeña fracción es soluble en hexano (Lercker y col., 1981), por lo tanto la extracción se realizó utilizando éter etílico

como solvente de extracción, a fin de obtener el extracto etéreo (EE) y, a continuación, se procedió a cambiar el solvente en el extractor colocando hexano, obteniéndose así el extracto hexánico (EH). Por lo tanto, a partir de cada muestra de jalea real liofilizada se obtuvieron dos extractos lipídicos (EE y EH) y un extracto desgrasado (ED).

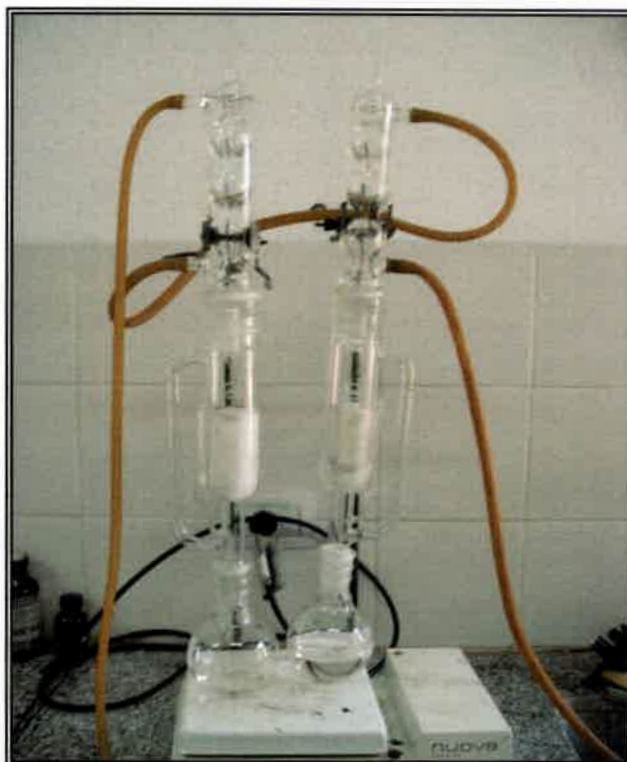


Figura 6: Extracción de lípidos utilizando extractor Soxhlet

5. Cepas bacterianas

A los efectos de evaluar la actividad antibacteriana de las muestras de jalea real se utilizaron cepas bacterianas de referencia y cepas bacterianas aisladas de infecciones superficiales en seres humanos, de mastitis en bovinos y otras procedentes de diversos orígenes. Las cepas bacterianas que se obtuvieron de infecciones superficiales en seres humanos y las procedentes de diversos orígenes fueron tipificadas en el Laboratorio de Microbiología del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Universidad Nacional de Río Cuarto mediante la realización de tinción de Gram, seguida de la caracterización microbiológica mediante la realización de pruebas bioquímicas y de

desarrollo descriptas en el Manual Bergey's (1994). Las cepas de *Enterococcus* fueron tipificadas con API ID 32 STREP.

De todas las cepas aisladas a campo a partir de leche de animales con mastitis bovina, tres se obtuvieron a partir de tambos de Río de Janeiro (Brasil) y se tipificaron mediante pruebas de catalasa, coagulasa, resistencia a bacitracina, reducción de nitrato, fermentación de maltosa y producción de acetoina, por el laboratorio de Bacteriología del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Universidad Federal Rural de Río de Janeiro, Brasil y gentilmente cedidas por la Dra. Shana Mattos de Oliveira Coelho (Mattos de Oliveira Coelho, 2006). Todas las demás cepas aisladas a campo a partir de leche de animales con mastitis bovina se obtuvieron de tambos de la Cuenca Villa María, Provincia de Córdoba (Argentina) y fueron tipificadas por la Microbióloga Silvana A. Dieser (tercer informe de avance de Tesis Doctoral) (Dieser, 2011) y gentilmente cedidas por la Dra. Liliana Odierno (Laboratorio de Genética Microbiana, Departamento de Microbiología e Inmunología, Universidad Nacional de Río Cuarto).

Las cepas bacterianas utilizadas en el presente trabajo se listan en las Tablas 5, 6, 7 y 8. Además de las cepas bacterianas aisladas de infecciones superficiales en seres humanos y de mastitis en bovinos se utilizaron, a modo comparativo, cepas de referencia y aislamientos de diversos orígenes.

Tabla 5: Cepas bacterianas de referencia

<i>CEPAS BACTERIANAS</i>	<i>ORIGEN</i>
Bacterias Gram positivo	
✓ <i>Enterococcus faecalis</i> 1	✓ ATCC 29212
✓ <i>Micrococcus luteus</i>	✓ ATCC 9341
✓ <i>Staphylococcus aureus</i> MS 1	✓ ATCC 25923
✓ <i>Streptococcus agalactiae</i> 1	✓ ATCC 27956
✓ <i>Streptococcus dysgalactiae</i> 1	✓ ATCC 27957

MS: Meticilina Sensible



Bacterias Gram negativo	
<ul style="list-style-type: none"> ✓ <i>Enterobacter sp.</i> ✓ <i>Escherichia coli A</i> ✓ <i>Escherichia coli B</i> ✓ <i>Escherichia coli C</i> ✓ <i>Escherichia coli D</i> 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Cuenca Villa María (Córdoba, Argentina) ✓ Cuenca Villa María (Córdoba, Argentina) ✓ Cuenca Villa María (Córdoba, Argentina) ✓ Cuenca Villa María (Córdoba, Argentina) ✓ Cuenca Villa María (Córdoba, Argentina)

MS: Meticilina sensible, MR: meticilina resistente

Tabla 8: Cepas bacterianas aisladas de diversos orígenes

CEPAS BACTERIANAS	ORIGEN DEL AISLAMIENTO
Bacterias Gram positivo <ul style="list-style-type: none"> ✓ <i>Staphylococcus epidermidis</i> 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Leche bovina
Bacterias Gram negativo <ul style="list-style-type: none"> ✓ <i>Pseudomonas aeruginosa 1</i> ✓ <i>Escherichia coli</i> ✓ <i>Klebsiella pneumoniae</i> 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Agua de pozo ✓ Agua de pozo ✓ Compostaje de ave

5.1. Conservación y propagación de cepas bacterianas

Cada una de las cepas bacterianas, a excepción de las pertenecientes al género *Streptococcus*, se sembró en cajas de Petri conteniendo Agar Cerebro Corazón (ACC) mediante estrías por agotamiento con el ansa de Kolle, hasta lograr el desarrollo de colonias aisladas. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h. Posteriormente, se realizó la tinción de Gram a cada una de las colonias aisladas, logrando de esta manera observar al microscopio óptico sus características morfológicas, tintoriales y pureza.

Todas las colonias bacterianas excepto los *Streptococcus sp.* se subcultivaron en tubos que contenían ACC inclinado, los que se incubaron a 37 °C durante unas 24 h. Al cabo de ese tiempo, los cultivos se conservaron a 4 °C, subcultivándolos mensualmente a nuevos tubos de ACC. Paralelamente, estas mismas cepas se congelaron a -18 °C en tubos viales conteniendo Caldo Cerebro Corazón (CCC), adicionando como crioprotector 20% de glicerol.

Para la propagación de cepas pertenecientes al género *Streptococcus* se utilizó un medio de cultivo denominado Agar Crecimiento *Streptococcus* (ACS). Las cepas de *Streptococcus sp.* se aislaron mediante estrías por agotamiento en cajas de Petri

conteniendo ACS; los aislamientos, una vez identificados, se subcultivaron en tubos conteniendo ACS inclinado. Estos tubos se incubaron a 37 °C durante unas 24 h y los cultivos obtenidos se conservaron a 4 °C, realizando subcultivos quincenales a nuevos tubos de ACS. Para prolongar el tiempo de conservación de estas cepas, los primo-aislamientos se subcultivaron desde el ACS a tubos viales conteniendo el medio de cultivo Leche Extracto de Levadura (LEL) adicionado de glicerol al 10%. Inmediatamente después de sembrados estos tubos viales se congelaron a -18 °C.

La composición de los medios de cultivo utilizados se detalla en el Anexo I.

5.2. Preparación del inóculo bacteriano utilizado en los ensayos de actividad antibacteriana

Con el fin de poder realizar comparaciones sobre la actividad antibacteriana de las muestras de jalea real y la de sus correspondientes extractos, se efectuaron inóculos bacterianos estandarizados de todas las cepas estudiadas. Para ello, se trabajó con una densidad adecuada de bacterias, la que oscilaba entre 10^6 y 10^7 UFC/mL (Unidades Formadoras de Colonias por mL). Esta concentración bacteriana permitió lograr un crecimiento confluyente que fue apropiado para visualizar los correspondientes halos de inhibición del crecimiento.

Para lograr una densidad microbiana de trabajo que fuese adecuada, cada una de las bacterias ensayadas se sembró a partir de los tubos de ACC (o de ACS en el caso de *Streptococcus sp.*) que habían sido conservados a 4 °C, a tubos de hemólisis que contenían 2 mL de CCC. Los tubos de hemólisis se incubaron en estufa a 37 °C durante 18 h, obteniendo así cultivos denominados “overnight”. A partir de estos cultivos se realizaron diluciones logarítmicas en base 10 (\log_{10}) en Caldo Tripticasa Soya (CTS); de cada una de estas diluciones se sembraron 100 μ L, por duplicado, sobre Agar Tripticasa Soya (ATS) contenido en placas de Petri para realizar de ese modo el recuento de colonias bacterianas en superficie. Simultáneamente, en cada dilución se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda (λ) de 620 nm. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h y posteriormente se realizó el recuento en aquellas placas que contenían entre 30 y 300 colonias. Así, para los diferentes ensayos

de actividad antibacteriana, se utilizaron como inóculos bacterianos aquellas diluciones correspondientes a un recuento bacteriano entre 10^6 y 10^7 UFC/mL.

6. Ensayos de evaluación de la actividad antibacteriana de la jalea real

La actividad antibacteriana de las muestras de JR R y de JR NG fue estudiada comparando tres metodologías (técnica de difusión en disco, técnica de dilución en tubo y técnica de difusión en pozo) para así evaluar y seleccionar cuál de ellas es la más eficiente para determinar esta actividad. Una vez obtenidos los resultados se continuó con la investigación de las muestras de JR C y JR LP realizando la técnica de difusión en pozo. Posteriormente estos estudios se completaron evaluando cuantitativamente la actividad antibacteriana mediante la técnica de microdilución en caldo en la muestra de JR C.

6.1. Técnica de difusión en disco

Alícuotas de 10 μ L de las diferentes diluciones de jalea real se prepararon tal como se indica en el punto 3 de esta misma sección. Estas diluciones se adsorbieron en discos de papel de filtro estériles de 5 mm de diámetro. Los discos se colocaron sobre la superficie de placas de Petri conteniendo Agar Müeller-Hinton (AMH) (NCCLS, 1987). Las placas, previamente se sembraron en superficie con 100 μ L del correspondiente inóculo bacteriano, el cual se preparó como según se indica en el punto 5.2 de esta misma sección. Una vez sembradas las placas se dejaron durante 30 min a temperatura ambiente para permitir la difusión del inóculo de los discos embebidos en el agar. Luego, las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h. Al cabo de la incubación, se midieron los diámetros de los halos de inhibición del crecimiento (Bauer y col., 1966; Finelgold y Baron, 1992; NCCLS, 1990a). Todos estos ensayos se efectuaron por triplicado.

6.2. Determinación la de concentración inhibitoria mínima (CIM) y de la concentración bactericida mínima (CBM) de jalea real por la técnica de dilución en tubo

Esta técnica se realizó con las muestras JR C y JR NG. Para la obtención de CIM se agregó 1 g de jalea real al primer tubo de una serie de 9 tubos conteniendo cada uno 1 mL de Caldo Müeller-Hinton (CMH). A partir del primer tubo se realizaron diluciones logarítmicas en base 2 (\log_2) de la jalea real continuando hasta el tubo 8 inclusive. Posteriormente, se agregó a cada tubo 1 mL del inóculo bacteriano con la densidad correspondiente (ver punto 5.2 de ésta sección). El tubo 9 (sin el agregado de jalea real), se utilizó como control de crecimiento bacteriano. Paralelamente, se prepararon una serie de tubos "blanco". Para ello, se procedió de igual manera que la descrita anteriormente, sólo que se reemplazó el inóculo bacteriano por 1 mL de CTS, caldo en que se realizó la dilución correspondiente para cada inóculo. Todos los tubos se incubaron a 37 °C y con agitación a 300 rpm durante 24 h para favorecer el continuo contacto de la jalea real con el cultivo y evitar así la precipitación de la misma.

Luego de la incubación se realizó la lectura de la absorbancia a una longitud de onda $\lambda = 620$ nm. A la absorbancia obtenida a partir de cada tubo se le restó la absorbancia de su correspondiente blanco, obteniendo así una absorbancia neta para cada tubo. Los ensayos se realizaron por triplicado, obteniendo un valor promedio de absorbancia neta para cada tubo.

Las concentraciones de jalea real obtenidas en cada tubo se detallan en la Tabla 9:

Tabla 9: Concentración de jalea real evaluada por la técnica de dilución en tubo

Tubo N°	Concentración de jalea real (mg/mL)
1	250
2	125
3	62,5
4	31,3
5	15,6
6	7,8
7	3,9
8	1,95
9	0 (Control de crecimiento bacteriano)

La CIM se obtuvo gráficamente utilizando el programa ORIGIN 6.0, siendo la misma el punto de intersección de dos regresiones lineales realizadas en un gráfico donde el eje Y correspondió a las absorbancias netas, obtenidas de los tubos, y el eje X a las concentraciones de jalea real de cada tubo en mg/mL (Devienne y Raddi, 2002).

Se determinó también la CBM, que corresponde a la concentración mínima de jalea real que es capaz de eliminar a las bacterias. Para ello, a partir de los tubos 1 a 9 se depositaron 100 μ L sobre la superficie de placas de Petri conteniendo AMH. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h considerando la ausencia de crecimiento como resultado positivo de la acción bactericida de las muestras de jalea real. Los ensayos se realizaron por triplicado (Bauer y col., 1966; Finelgold y Baron, 1992; NCCLS, 1990b).

6.3. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de jalea real por la técnica de difusión en pozo

En placas de Petri, se sembró por el método de la placa vertida en AMH, 200 μ L de los inóculos bacterianos (preparados según lo descrito en el punto 5.2 de esta sección) de cada una de las cepas pertenecientes al género *Staphylococcus*, *M. luteus* y bacterias Gram negativo. Aunque el NCCLS indica la utilización de AMH, adicionado con sangre de carnero al 5 %, para determinar la susceptibilidad a jalea real o sus componentes activos en aquellas cepas bacterianas pertenecientes a los géneros *Streptococcus* y *Enterococcus*, en el presente trabajo de Tesis se utilizó ACC debido a que no fue posible adquirir el AMH adicionado con sangre de carnero al 5%. Por lo tanto, se sembraron 100 μ L de los inóculos bacterianos de tales cepas (preparados según lo descrito en el punto 5.2 de esta sección) sobre la superficie de ACC, los cuales se esparcieron con espátula de Drigalsky hasta su absorción total (NCCLS, 1987).

A continuación, con sacabocados, se realizaron orificios o pozos de 5 mm de diámetro en el agar cuya profundidad llegó hasta el fondo de la placa. En los pozos se depositaron 50 μ L de cada una de las diferentes diluciones de jalea real (preparada según lo descrito en el punto 3 de esta sección). Luego, las placas se dejaron a temperatura ambiente durante 30 min para permitir la difusión de las diluciones y, posteriormente, se incubaron sin invertir a 37 °C durante 24 h. Al cabo de la incubación se midieron los halos de inhibición del crecimiento formados alrededor de cada pozo u orificio. Se

determinó la CIM como la concentración mínima de jalea real que fue necesaria para inhibir completamente el crecimiento bacteriano (Finelgold y Baron, 1992). La composición de los medios de cultivo utilizados se detalla en el Anexo I.

Todos estos ensayos se realizaron por triplicado con la totalidad de las cepas bacterianas utilizando la muestra JR C mientras que para las muestras JR R, JR NG y JR LP sólo algunas de las cepas pudieron ser evaluadas por ser insuficiente la cantidad de JR disponible para realizar los ensayos, tal como se explicó en el punto 1 de esta sección.

6.3.1. Análisis estadístico

Los valores de CIM obtenidos por la técnica de difusión en pozo se analizaron estadísticamente. Para el análisis, las bacterias se agruparon en cuatro grupos o categorías: *Enterococcus sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus sp.* y bacterias Gram negativo. Para comparar los valores de CIM obtenidos con los distintos grupos bacterianos y con los diferentes lugares de procedencia de las muestras de jalea real (Regional, Norte Grande, Corrilobo y La Pampa) se llevó a cabo un ANOVA (Análisis de Varianza) de dos vías y, a posteriori, se realizó un test de Tukey para cada factor. Este test compara pares de medias: en el caso del grupo bacteriano se comparan las medias de los cuatro grupos entre sí y, para el caso del lugar de procedencia, se comparan las medias de los cuatro lugares entre sí. Los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas se verificaron utilizando el test de Shapiro-Wilks y Levenne, respectivamente.

6.4. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de jalea real por la técnica de microdilución en caldo

Para evaluar la actividad antibacteriana por la técnica de microdilución en caldo utilizó la muestra de JR C siguiendo la metodología descrita por Mann y Markham (1998) con algunas modificaciones, pues en lugar de la resazurina se utilizó como indicador del crecimiento bacteriano una solución del colorante vital cloruro de 2,3,5 - trifenil tetrazolio (TTC) al 0,05 % p/v. De acuerdo a la bibliografía, las sales de

tetrazolium son utilizadas en diversas concentraciones (Bedwell y col., 2001; Gende y col., 2008; Lee y col., 2007; Masoko y col., 2005; Pereira y col., 2005); en el presente trabajo, a concentraciones del colorante menores que 0,05 % p/v, la visualización del cambio de color no se observó correctamente debido a que el color rosa fue poco notorio.

Se preparó una “solución madre” de 500 mg/mL de JR C diluida en agua destilada estéril, pues esa fue la concentración más alta en la cual la JR C *per se* fue incapaz de reducir el TTC a formazán. A partir de esta solución madre se realizaron diluciones sucesivas en base \log_2 usando una solución acuosa de agar-agar al 0,15 %, la cual fue utilizada como emulsificante. En una microplaca de 96 pocillos se colocaron desde el pocillo 2 al 10, 170 μ L del inóculo bacteriano a estudiar, que se preparó como se describió en el punto 5.2 pero suplementado con agar-agar al 0,15 %. Se agregaron 20 μ L de cada una de las diluciones de JR C en los pocillos. En el pocillo 1 se procedió de igual manera, pero se adicionaron 20 μ L de la “solución madre” de JR C sin diluir. Por último, se adicionaron 10 μ L del TTC al 0,05 % p/v en todos los pocillos. La microplaca se incubó a 37 °C durante 24 h y la lectura de las microplacas se efectuó visualmente para determinar la CIM considerando a la misma como la última dilución de JR C que no presentó ningún color rosado o rojo, donde el pocillo permaneció sin cambios de color.

Los ensayos se realizaron por triplicado. Se realizaron controles positivos y negativos. El control positivo de crecimiento bacteriano consistió en 170 μ L del inóculo a ensayar, 20 μ L del diluyente sin jalea real (solución de agar-agar al 0,15 %) más 10 μ L de TTC; mientras que el control negativo consistió en 170 μ L de CMH suplementado con solución de agar-agar al 0,15%, 20 μ L de la correspondiente dilución de JR C y 10 μ L de TTC.

La composición de los medios de cultivo utilizados se detalla en el Anexo I.

7. Ensayos de actividad antibacteriana de extractos etéreos (EE) y extractos desgrasados (ED) de jalea real por la técnica de difusión en pozo

Para evaluar la actividad antibacteriana, los EE de las JR NG, JR C y JR LP (obtenidos como se explicó en el punto 4 de esta sección) se disolvieron en dimetil

sulfóxido (DMSO), pues resultó el solvente más indicado para disolver lípidos de JR, ya que produce una disolución completa de los mismos sin ejercer efecto inhibitorio sobre las cepas bacterianas utilizadas. Se obtuvieron “soluciones madres” puras de EE de JR NG con una concentración de 68 mg/mL, de EE de JR C con 66 mg/mL y de EE de JR LP con 84 mg/mL. A partir de cada una de las soluciones madres se realizaron diluciones en base \log_2 en DMSO obteniendo las diluciones desde $\frac{1}{2}$ a $\frac{1}{64}$.

Los ED remanentes se disolvieron con agua destilada estéril y se prepararon “soluciones madres” con una concentración de 470 mg/mL (para el ED de JR NG), de 400 mg/mL (para el ED de JR C) y de 550 mg/mL (para el ED de JR LP). A partir de las mismas se realizaron diluciones en base \log_2 en agua destilada estéril, obteniendo las diluciones desde $\frac{1}{2}$ a $\frac{1}{64}$.

Los inóculos bacterianos fueron preparados según lo descrito en el punto 5.2 de esta sección. En placas de Petri, se sembró por el método de la placa vertida en AMH, 200 μ L de los inóculos bacterianos de las cepas de *Staphylococcus sp.* y bacterias Gram negativo utilizadas en este ensayo. Las cepas de *Streptococcus sp.* y *Enterococcus sp.* se sembraron en superficie de placas de Petri con ACC, colocando 100 μ L de los correspondientes inóculos, los cuales se esparcieron con espátula de Drigalsky hasta su absorción total.

Luego se procedió de acuerdo con la técnica descrita en el punto 6.3 de esta sección hasta obtener la medida del diámetro de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano formados alrededor de cada pozo u orificio. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado. La composición de los medios de cultivo utilizados se detalla en el Anexo I.

8. Ensayo de la actividad antibacteriana de extractos lipídicos de jalea real por la técnica de bioautografía indirecta

8.1. Separación de compuestos de los extractos etéreo (EE) y hexánico (EH) de jalea real por cromatografía en capa delgada (CCD)

Para la realización de la técnica de CCD, se utilizaron cromatofolios de diferentes tamaños dependiendo del ensayo, compuestos por una fase estacionaria (FE)

polar de sílica gel, 2-25 μm ; con un espesor de la capa de 0,2 mm y un diámetro de poro medio de 60 Å, con indicador de fluorescencia 254 nm (Fluka). Esta FE contiene un gran número de grupos hidroxilos que interactúan con los grupos funcionales de los lípidos. Como resultado, las moléculas lipídicas son separadas de acuerdo al número de las funcionalidades polares, y, en algunos casos, de acuerdo a su localización espacial. Las CCD de sílica gel requieren fases móviles menos polares y para la separación de lípidos simples se requiere la utilización de dos o tres solventes (Momchilova y Nikolova-Damyanova, 2008).

En principio, se prepararon diferentes “soluciones madres” (dependiendo del ensayo a realizar) de los extractos de cada muestra. Se utilizó éter etílico como solvente para los EE y hexano para los EH. A continuación, con un capilar, se realizó la siembra del extracto a probar, obteniendo una banda de un 1 cm de ancho. Los cromatofolios se corrieron en una cámara de desarrollo, previamente saturada con los vapores de la fase móvil (FM). Se evaluaron diferentes FM a fin de obtener aquellas que mostraran mejor resolución de los compuestos bajo estudio. Una vez obtenidos los cromatogramas, se dejaron secar y se observaron bajo luz ultravioleta (UV) a 254 nm; posteriormente, se seleccionaron aquellas donde se visualizaban bandas separadas y definidas, correspondientes a diferentes compuestos presentes en el extracto y se midieron los factores de retención (R_f) de las mismas.

8.2. Técnica de bioautografía indirecta

Los ensayos se realizaron, en un principio, sobre la cepa de referencia *Staphylococcus aureus* MS 1 ATCC 25923. La elección de la misma se debió a que resultó ser una de las cepas más sensibles a las muestras de JR C y JR NG completas, siendo además una cepa de referencia.

Asimismo y a modo comparativo para el EE de JR C, se realizaron ensayos de bioautografía utilizando las cepas que resultaron ser las más sensibles dentro de cada grupo de bacterias aisladas de mastitis bovina, cuando se analizaron por la técnica de difusión en pozo con JR C completa. Las cepas utilizadas fueron *Staphylococcus aureus* A, *Streptococcus agalactiae* B y *Escherichia coli* B.

Cada uno de los cromatogramas que fueron desarrollados y seleccionados para realizar este ensayo se colocaron dentro de cajas de Petri y se esterilizaron por exposición a la luz UV durante 1 h. Posteriormente, se agregó sobre cada uno de ellos, 15 mL de AMH semisólido (ver composición del medio de cultivo en Anexo I) conteniendo, en primera instancia, 200 μ L del inóculo bacteriano y, posteriormente, para mejorar la visualización de las zonas de inhibición del crecimiento, se aumentó la cantidad del inóculo a 1.000 μ L del mismo. La cantidad de inóculo bacteriano adicionado se fue modificando a fin de mejorar la visualización de las zonas de inhibición del crecimiento. Además, se adicionó 1 mL de solución de TTC al 0,05% (p/v) para favorecer también dicha visualización (Gende y col., 2008; Pereira y col., 2005). Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h. Las bacterias muertas por acción del antibacteriano en los cromatogramas no fueron capaces de reducir el colorante vital TTC, por lo que no se observó el color rojizo característico del formazán en las zonas correspondientes a las bandas del compuesto activo en el extracto y esas zonas decoloradas se identificaron como las zonas de inhibición del crecimiento bacteriano.

La composición de los medios de cultivo utilizados se detalla en el Anexo I.

9. Ensayos de actividad antibacteriana de la fracción lipídica activa (FLA) del extracto etéreo de JR C por la técnica de microdilución en caldo

9.1. Obtención de la fracción lipídica activa mediante cromatografía en columna de sílica

Para la realización del presente ensayo se utilizó la muestra JR C debido a que, de todas las muestras estudiadas en el presente trabajo de investigación fue la más activa. Se probó sobre un mayor número de cepas bacterianas y fue la única que se pudo conseguir en mayor cantidad.

A fin de separar y obtener cada uno de los diferentes compuestos del EE de JR C, que previamente fueron estudiados por CCD, se procedió a realizar la siembra del EE de JR C en una columna de vidrio, con la finalidad de realizar una cromatografía en columna y obtener así mayor cantidad de los componentes en estudio. Para ello, un gramo EE de JR C se disolvió en éter etílico y se mezcló con una pequeña cantidad de

sílica gel, se evaporó el solvente y se agregó un pequeño volumen de hexano, suficiente para resuspender la mezcla de EE y sílica gel. La mezcla fue agregada sobre la superficie de una columna de vidrio conteniendo 25 g de sílica gel (60 Å de tamaño de poro y 35-75 µm de tamaño de partícula) como FE, cuidando de no generar disturbios en la misma. Se utilizó una mezcla de Et:H en proporciones 65:35 como FM y se aplicó presión (P) mediante N₂ gaseoso permitiendo un flujo constante de la FM a través de la columna hasta que la superficie de la misma comenzó a secarse, consiguiendo así el drenaje de los componentes de la muestra dentro de la columna (Pavia y Lampman, 1988; Pomeranz y Meloan, 1994). Se colectaron 113 fracciones de volumen conocido en viales de vidrio limpios. Luego, se evaporó el solvente de cada vial en baño de agua termostaticado a 40 °C aproximadamente hasta reducir el volumen.

Con la finalidad de monitorear la separación por cromatografía en columna, se realizó CCD sembrando el contenido de cada vial en cromatofolios de igual característica a los que fueron utilizados en el punto 8.1. Los cromatofolios se desarrollaron utilizando la misma FM que la agregada a la columna y luego de secarse a temperatura ambiente durante unos minutos se observaron bajo luz UV (Pavia y Lampman, 1988; Pomeranz y Meloan, 1994). Posteriormente, el volumen contenido en los viales de vidrio correspondientes a una misma fracción, que previamente habían sido obtenidos a partir de la cromatografía en columna, se recolectaron en recipientes limpios y previamente tarados. La fracción lipídica activa (FLA), correspondiente a un R_f: 0,22 y que mostró actividad antibacteriana por la técnica de bioautografía indirecta, se conservó en heladera hasta su utilización para evaluar la actividad antibacteriana por la técnica de microdilución en caldo.

Además, se sembró en CCD el 10-HDA como patrón a fin de realizar estudios comparativos, ya que es el principal ácido graso de la jalea real y posee actividad antibacteriana (Blum y col., 1959; Fujiwara y col., 1990; Hornitzky, 1998).

9.2. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de la fracción lipídica activa (FLA) del EE de JR C y del ácido 10-hidroxi-2-decenoico (10-HDA) patrón por la técnica de microdilución en caldo

Se procedió a evaluar la actividad antibacteriana de la FLA del EE de JR C y del 10-HDA sobre cepas bacterianas causantes de infecciones superficiales en seres humanos y mastitis en bovinos por la técnica de microdilución en caldo, siguiendo la metodología descrita por Mann y Markham (1998) con las modificaciones ya explicadas anteriormente. Se preparó una “solución madre” de aproximadamente 24 mg de FLA del EE de JR C /mL, incapaz de reducir al indicador, en una mezcla estéril de DMSO/agar-agar al 0,15 % en proporción 50:50. Además, se preparó una “solución madre” de aproximadamente 28 mg del 10-HDA/mL. A partir de ambas, se realizaron diluciones \log_2 en una solución de agar-agar al 0,15 %. En una microplaca de 96 pocillos se colocaron desde el pocillo 1 al 10, 170 μ L del inóculo bacteriano en CMH suplementado con agar-agar al 0,15 %. Se agregaron 20 μ L de las diluciones de la FLA del EE de la JR C (o del 10-HDA) en los pocillos 2 a 10. En el pocillo 1 se adicionaron 20 μ L de la “solución madre” sin diluir, de la FLA o del 10-HDA, según correspondiera. Por último, se adicionaron 10 μ L de la solución de TTC al 0,05 % p/v en todos los pocillos. La microplaca se incubó durante 24 h a 37 °C. Al cabo de la incubación, la CIM se determinó visualmente. Ésta, fue determinada como la menor dilución de FLA (o del 10-HDA) que no presentó color rosado o rojizo (el pocillo permanece sin cambios de color).

Los ensayos se realizaron por triplicado. Se realizaron controles positivos y negativos. El control positivo de crecimiento bacteriano consistió en 170 μ L del inóculo a ensayar, 20 μ L del diluyente sin FLA o 10-HDA (agar-agar al 0,15 %) más 10 μ L de TTC al 0,05 % p/v; mientras que el control negativo consistió en 170 μ L de CMH suplementado con agar al 0,15%, 20 μ L de cada dilución de FLA (o del 10-HDA) y 10 μ L de solución de TTC al 0,05 % p/v. El control negativo se realizó con la finalidad de descartar la posibilidad de que cada dilución de la FLA reduzca el TTC.

La composición de los medios de cultivo utilizados se detalla en el Anexo I.

10. Estudio de la composición química de la fracción lipídica activa del EE de JR C

A fin de caracterizar químicamente el compuesto con actividad antibacteriana de la FLA del EE de JR C se procedió a realizar una cromatografía gaseosa con detector de ionización de llamas (GC-FID).

10.1. Derivatización de la fracción lipídica activa (FLA) y del ácido 10-hidroxi-2-decenoico (10-HDA)

Debido a que la FLA del EE de JR C mostró una única banda cuando se realizó la CCD con un R_f : 0,22, y que el R_f del 10-HDA patrón coincidió con el de la muestra, se pudo suponer que la FLA estaría compuesta por dicho ácido graso. Con la finalidad de poder estudiar por GC la composición química de la FLA del EE de JR C se realizó la derivatización de la misma y del 10-HDA patrón, utilizando trimetilsilil - diazometano disuelto en hexano, para obtener los correspondientes FAME volátiles. Se pesó aproximadamente 2,5 mg de la FLA y del 10-HDA en frascos limpios. Posteriormente, se solubilizaron en 1 mL de una mezcla de metanol:hexano en proporción 9:5, luego se adicionó a la solución 200 μ L de metanol en exceso. A la mezcla se agregó trimetilsilil - diazometano gota a gota hasta que perduró el color amarillo. La reacción se realizó a temperatura ambiente durante 30 min. Luego se evaporó el solvente bajo corriente de N_2 . Se agregaron 500 μ L de hexano y se procedió a inyectar en el cromatógrafo gaseoso (Park y col., 2001).

10.2. Cromatografía gaseosa con detector de ionización de llamas (GC-FID)

Se realizó una GC-FID para estudiar la composición química de la FLA del EE de JR C y corroborar, por medio de la inyección del patrón 10-HDA, la presencia de este ácido graso con propiedades antibacterianas en la muestra JR C. Se utilizó nitrógeno como gas transportador y una columna HP5 (longitud: 30 m, diámetro interno: 0,25 mm y espesor de película: 0,25 μ m). Se realizó un gradiente de temperaturas de 70 °C a 250 °C a una velocidad de 10 °C/ min. Temperatura del inyector: 250 °C.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Caracterización fisicoquímica de las muestras de jalea real

Tras los ensayos fisicoquímicos realizados a fin de caracterizar las muestras de jalea real, se obtuvieron los valores correspondientes para cada determinación y se compararon con las correspondientes exigencias del CAA en cuanto a las características analíticas de composición que debe poseer una muestra de jalea real virgen no liofilizada (Tabla 10) (Código Alimentario Argentino actualizado, 2010b).

Tabla 10: Características fisicoquímicas de las muestras de jalea real estudiadas en comparación con lo exigido por el CAA para jalea real virgen no liofilizada

Análisis fisicoquímicos	JR R	JR NG	JR C	JR LP	Exigencias del CAA
Humedad (g/100g)	65	60,3	65,5	65,5	60 - 70 %
pH	4,2	3,7	3,9	4,3	3,4 - 4,5 %
Índice de acidez (mg KOH/g)	19	23	24	25	23 - 48 %
Proteínas (g/100g)	11	13,7	10,2	11	11 - 15 %
Lípidos totales (g/100g)	4,4	3,8	6,4	5	5 - 7 %
Cenizas (g/100g)	4,6	0,9	1	1,1	0,8 - 1 %
Azúcares reductores (glucosa + fructosa) (g/100g)	7,5	9	11	10	10 - 15 %
Sacarosa (g/100g)	2,6	2,2	2,4	2,6	Máximo: 5 %
Relación azúcares reductores / proteínas	0,7	0,7	1,1	0,9	0,8 - 1,2

En base a los resultados obtenidos, se observa que la muestra de JR NG cumplió con lo exigido por el CAA en cuanto a humedad, pH, índice de acidez, proteínas, cenizas y sacarosa. El valor obtenido para el contenido lipídico total, tras la aplicación de la metodología anteriormente descrita, se encuentra levemente por debajo del mínimo exigido por la normativa argentina. Lo mismo sucede con los azúcares reductores determinados por HPLC.

Para el contenido lipídico total, la diferencia podría ser debida a la metodología empleada, mientras que, en el segundo, la diferencia podría deberse a que mediante HPLC sólo se determinaron glucosa y fructosa como azúcares reductores. Es por esto que la relación azúcares reductores/proteínas es menor al valor mínimo exigido, ya que el valor obtenido de azúcares reductores en la muestra esta por debajo de él. La bibliografía consultada cita otros valores para el contenido lipídico total en jalea real fresca, donde el intervalo es más amplio respecto del exigido por CAA, siendo el mismo

del 3 al 8%. Esta diferencia podría deberse a que dichos valores corresponden a un estudio comparativo entre las distintas metodologías empleadas por diferentes autores para realizar las determinaciones de lípidos totales de muestras de jalea real en distintos países, tales como Suiza, Bulgaria, Brasil, Italia, entre otros. Por el mismo motivo, también existen variaciones en los valores de otros parámetros fisicoquímicos de jalea real, como el contenido de agua, proteínas totales, carbohidratos, minerales, etc. Los valores obtenidos por los diferentes autores, en general, son similares. No obstante, la variabilidad en algunos parámetros (azúcares y lípidos) puede deberse a que las muestras de jalea real provienen de diferentes lugares, de diferentes tiempos de producción, sumado a que se utilizan diferentes métodos de muestreo y diferentes metodologías analíticas (Sabatini y col., 2009).

Por lo tanto, se determinó que la muestra JR NG cumple con el CAA analizando en conjunto los valores de los análisis fisicoquímicos, lo que asegura su pureza y autenticidad en cuanto a su composición; esto permitió seguir con el estudio de sus propiedades antibacterianas. La JR NG se utilizó como muestra de referencia en los ensayos de actividad antibacteriana, debido a que se considera una muestra confiable en cuanto a su procedencia, ya que se conocen los procedimientos de obtención y recolección, los que se encuentran bajo la supervisión continua del Programa Apícola (PROAPI) dependiente de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación de la Nación (SAGPyA).

La muestra de JR R, cumple con las exigencias del CAA con respecto a: humedad, pH, proteínas y sacarosa. El análisis de lípidos arrojó un valor levemente inferior en comparación con el exigido por el CAA. Además, el índice de acidez es menor al valor mínimo exigido. Se podría deducir que la muestra posee menor cantidad de ácidos si se correlaciona el índice de acidez con el valor de pH obtenido (pH: 4,2), el cual se encuentra cerca del valor superior que acepta el CAA. Con respecto al porcentaje de cenizas, el valor obtenido es aproximadamente 5 veces superior al máximo permitido. Por otro lado, existen trabajos que indican que el contenido de cenizas en jalea real fresca se encuentra en un intervalo del 0,8 al 3,0%. En la jalea real, la cantidad de polen, así como la cera visible y partículas larvales debería ser mínima. Por lo tanto, el alto porcentaje de cenizas obtenido en la muestra JR R podría deberse a deficiencias en los procedimientos de recolección de la muestra en las colmenas,

pudiendo contener la misma restos de cera y polen, entre otras impurezas (Sabatini y col., 2009). El valor obtenido en el análisis de azúcares reductores por HPLC corresponde a 2,5 % menos del valor mínimo exigido. Esta diferencia podría estar relacionada con la metodología utilizada. La relación azúcares reductores/proteínas es menor al valor mínimo exigido, ya que el valor obtenido de azúcares reductores en la muestra está por debajo de lo normal, como ocurre en el caso de JR NG.

Las muestras JR C y JR LP cumplieron con lo exigido por el CAA con respecto a las determinaciones fisicoquímicas, aunque el valor para el porcentaje de proteínas de la muestra JR C, tras la aplicación de la metodología anteriormente descrita, se encuentra levemente por debajo del mínimo exigido por la normativa. En base a los resultados obtenidos en cuanto a la caracterización fisicoquímica de las muestras JR C y JR LP y, analizando los mismos en conjunto, se determinó que ambas muestras estudiadas cumplen con el CAA, lo que asegura su pureza y autenticidad en cuanto a su composición; esto permitió continuar con el estudio de sus propiedades antibacterianas.

La muestra de JR R demostró ser de menor calidad que el resto debido a que cumplió en menor grado con las exigencias del CAA. No obstante esto, se puede afirmar que la muestra de JR R es pura, ya que, en general, los valores obtenidos se encuentran dentro de los intervalos exigidos por el CAA.

En cuanto a color, olor, sabor y aspecto todas las muestras estudiadas mostraron las típicas características organolépticas descritas por el CAA; todas estas muestras de JR se presentaron como sustancias blanquecinas de consistencia gelatinosa, a menudo no homogénea debido a la presencia de gránulos insolubles de variado tamaño.

En la literatura se indica la composición de los componentes principales de la jalea real, como son las proteínas totales, carbohidratos y lípidos. Los valores obtenidos por los diferentes autores son bastante similares a pesar de la alta variabilidad de algunos de los parámetros (azúcares y lípidos). Esta variabilidad podría deberse a que los resultados presentados se refieren a muestras tomadas en diferentes lugares y en diferentes momentos de la producción, además se utilizaron diferentes métodos de muestreo y análisis. Por otra parte, la jalea real naturalmente no es homogénea y las condiciones ambientales no influyen significativamente en los componentes principales (Sabatini y col., 2009).

2. Análisis de carbohidratos de las muestras de jalea real por HPLC

Todos los ensayos se realizaron por triplicado inyectando en el cromatógrafo cada una de las muestras estudiadas. Asimismo se inyectó por separado cada patrón, también por triplicado, pues de esta manera se pudieron conocer los tiempos de retención correspondientes a cada uno de los azúcares que fueron estudiados. Posteriormente, se procedió a realizar la inyección de la mezcla de patrones para comparar estos cromatogramas obtenidos con los de las muestras. En la Figura 7 se muestra el cromatograma obtenido tras la inyección de la mezcla de los tres patrones.

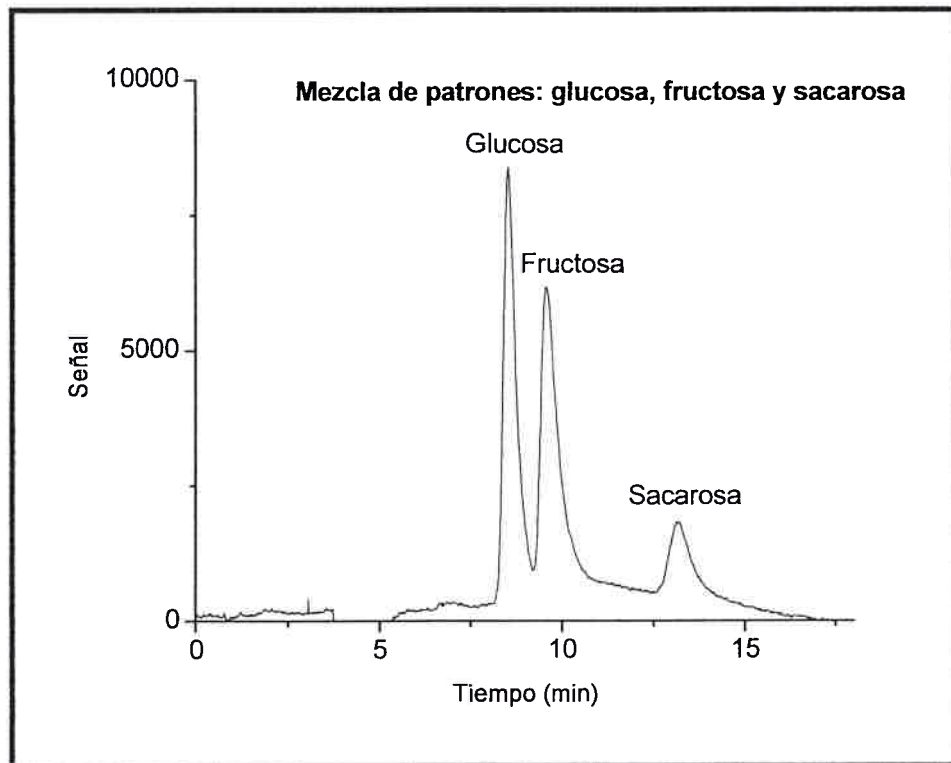


Figura 7: Cromatograma correspondiente a la mezcla de patrones: glucosa, fructosa y sacarosa ($1,0 \times 10^{-4}$ M) Volumen de inyección: 20 μ L

En este cromatograma se puede observar que el tiempo de retención para la glucosa corresponde a 8,5 min aproximadamente. En cuanto a fructosa su tiempo de retención es de 9,5 min y para sacarosa es de 13 min, aproximadamente.

En la Figura 8 se muestra el cromatograma obtenido tras una de las inyecciones de JR R. Se observa un cromatograma similar al obtenido con la inyección de la mezcla

de patrones (Figura 7), donde los tiempos de retención son semejantes y comparables. Además, dicha muestra posee los tres carbohidratos analizados y aparentemente, bajo las condiciones cromatográficas utilizadas, no se observan otros picos diferentes de los correspondientes a los carbohidratos estudiados.

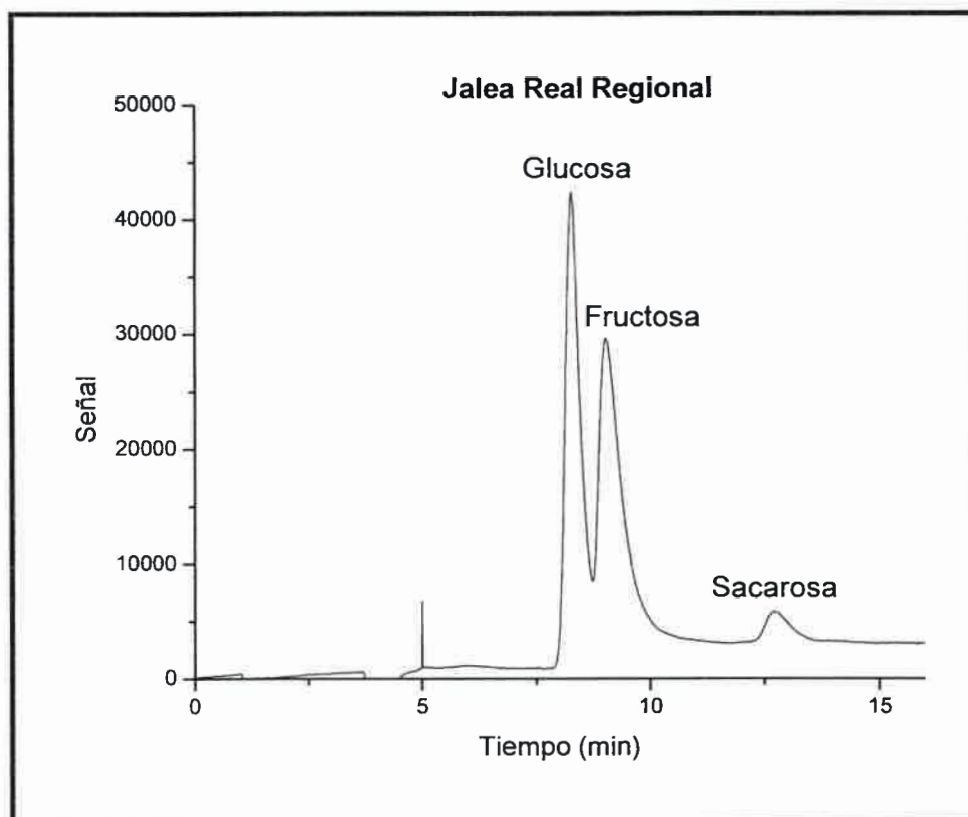


Figura 8: Cromatograma correspondiente a la inyección de JR R.
Volumen de inyección: 20 μ L

Como los ensayos se realizaron por triplicado, los valores informados en estos gráficos corresponden al valor promedio. En base a las áreas promedios de cada pico se realizaron los correspondientes cálculos teniendo en cuenta los patrones utilizados. Los resultados se expresan como % p/p (g/100g jalea real):

- ✓ JR R: Glucosa: 4 %; Fructosa: 3,5 % y Sacarosa: 2,6 %. Azúcares reductores (glucosa más fructosa): 7,5 % (Tabla 10).

El cromatograma obtenido después de una de las inyecciones de JR NG se muestra en la Figura 9, en el cual también se observa un cromatograma que es similar al obtenido tras la inyección de la mezcla de patrones (Figura 7), con tiempos de retención que son semejantes y comparables. Del mismo modo que en la muestra de JR R, la JR

NG posee los tres carbohidratos analizados y aparentemente, bajo las condiciones cromatográficas utilizadas, no se observan otros picos diferentes de los correspondientes a los carbohidratos estudiados.

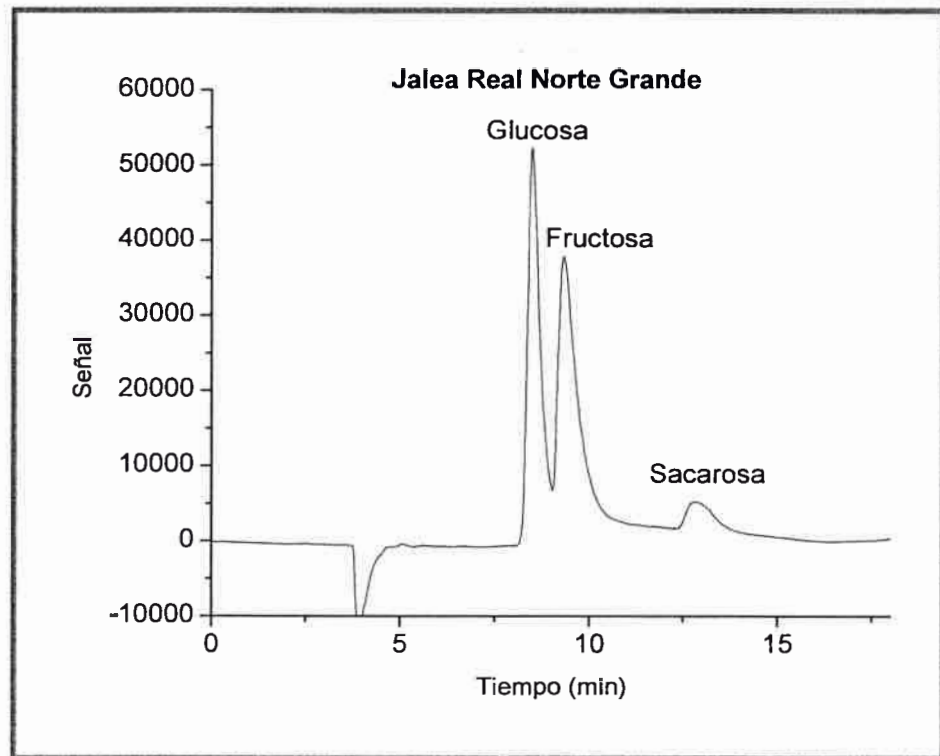


Figura 9: Cromatograma correspondiente a la inyección de JR NG.
Volumen de inyección: 20 μ L

En base a las áreas promedio de cada pico se realizaron los correspondientes cálculos teniendo en cuenta los patrones utilizados. Los resultados se expresan como % p/p (g/100g jalea real):

- ✓ JR NG: Glucosa: 4,6%; Fructosa: 4,4% y Sacarosa: 2,2%. Azúcares reductores (glucosa más fructosa): 9% (Tabla 10).

Los cromatogramas obtenidos tras las inyecciones de JR C y JR LP (no mostrados), resultaron similares al obtenido con la inyección de la mezcla de patrones (Figura 7), con tiempos de retención semejantes y comparables. Al igual que lo obtenido con las muestras JR R y la JR NG, las muestras JR C y JR LP poseen los tres carbohidratos analizados y aparentemente, bajo las condiciones cromatográficas utilizadas, tampoco se observan otros picos diferentes de los correspondientes a los carbohidratos estudiados.

En base a las áreas promedios de cada pico se realizaron los correspondientes cálculos teniendo en cuenta los patrones utilizados. Los resultados se expresan como % p/p (g/100g jalea real):

- ✓ JR C: Glucosa: 5%; Fructosa: 6% y Sacarosa: 2,4%. Azúcares reductores (glucosa más fructosa): 11% (Tabla 10).
- ✓ JR LP: Glucosa: 5,5%; Fructosa: 4,5% y Sacarosa: 2,6%. Azúcares reductores (glucosa más fructosa): 10% (Tabla 10).

Los principales azúcares encontrados en jalea real corresponden a glucosa, seguida de fructosa y sacarosa. Dependiendo de la edad y los alimentos de la colmena la glucosa constituye entre el 50 y 70% del total de los azúcares (Chen y Chen, 1995). Al igual que en la miel, los monosacáridos fructosa y glucosa son los principales azúcares de la jalea real (Sabatini y col., 2009).

3. Obtención de extractos lipídicos y extractos desgrasados de jalea real

Ha sido particularmente interesante estudiar la fracción lipídica de la jalea real, dado que el ácido graso 10-HDA que se encuentra en gran proporción en esta fracción. Este ácido graso posee propiedades antitumorales, inhibe la síntesis del colesterol y posee acción antiinflamatoria, entre otras (Tani y col., 2009). Además de las propiedades anteriormente mencionadas, se ha sugerido que además posee acción antibacteriana contra distintos microorganismos, tales como *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *S. hemolyticus*, *Enterococcus sp.*, etc., tanto *in vivo* como *in vitro* (Hornitzky, 1998; Isidorov y col., 2011; Melliou y Chinou, 2005). Asimismo, es conocida la actividad antibacteriana de los extractos desgrasados de jalea real, debido a la presencia de proteínas que poseen dicha propiedad, tales como la royalisina y las jelleinas (Fujiwara y col., 1990; Fontana y col., 2004).

Por lo tanto, se procedió a evaluar la actividad antibacteriana de los extractos lipídicos y de los correspondientes extractos desgrasados de las muestras JR NG, JR C y JR LP para de realizar comparaciones y determinar la presencia de actividad antibacteriana en ambos extractos de muestras de jalea real argentinas.

Una vez que fue realizada la liofilización a partir de 20 g de cada muestra de jalea real, se obtuvieron aproximadamente unos 7 g de extracto seco. El extracto fue colocado en un cartucho de papel y luego sometido a la técnica de extracción continua utilizando un extractor Soxhlet. Por esta técnica la mayor cantidad de lípidos fueron extraídos con éter etílico (lípidos polares) y una menor cantidad se extrajo con hexano (lípidos no polares). Resultados similares han sido informados por otros autores (Lercker y col., 1981).

De la JR NG se obtuvieron *circa* 680 mg en el EE y 100 mg en el EH; de la JR C *circa* 840 mg en el EE y 40 mg en el EH; y de la JR LP *circa* 700 mg en el EE y 60 mg en el EH. Luego de la aplicación de la metodología anteriormente descrita el rendimiento de lípidos, a partir de las muestras liofilizadas, fue de un 11 % para JR NG y JR LP y de un 13 % para JR C. Estos valores se corresponden con los exigidos por el CAA para el contenido lipídico total en jalea real liofilizada, los cuales se encuentran dentro de un intervalo variable entre un 10% al 35% (Código Alimentario Argentino actualizado, 2010b). Es importante aclarar que el porcentaje obtenido corresponde a los lípidos extraídos a partir de la utilización de dos solventes. Una vez realizada la obtención de los correspondientes extractos lipídicos con los solventes, en los cartuchos permanecieron los extractos desgrasados remanentes de cada muestra.

4. Preparación del inóculo bacteriano estandarizado utilizado en los ensayos de actividad antibacteriana

En la Tabla 11 se muestran los resultados obtenidos en los recuentos expresados en UFC/mL para cada una de las cepas bacterianas utilizadas en el presente trabajo de Tesis y sus correspondientes diluciones. Estas diluciones fueron posteriormente utilizadas para efectuar los diferentes ensayos de evaluación de la actividad antibacteriana. Como puede observarse, en la mayoría de las bacterias los recuentos óptimos elegidos para ser utilizados (entre 10^6 y 10^7 UFC/mL) correspondieron a la primera o segunda dilución decimal que se realizó a partir del cultivo que había sido incubado durante unas 18 h (“cultivo overnight”).

Tabla 11: Estandarización del inóculo bacteriano de cada cepa a ensayar

Cepas bacterianas Gram positivo	Dilución	UFC/mL
<i>Enterococcus faecalis</i> 1	10 ⁻¹	3,2 x 10 ⁷
<i>Enterococcus faecalis</i> 2	10 ⁻¹	8,3 x 10 ⁶
<i>Enterococcus faecalis</i> 3	10 ⁻¹	1,5 x 10 ⁷
<i>Enterococcus faecalis</i> 4	10 ⁻¹	3,5 x 10 ⁷
<i>Enterococcus faecium</i>	10 ⁻¹	2,7 x 10 ⁷
<i>Staphylococcus aureus</i> MS1	10 ⁻¹	3,8 x 10 ⁷
<i>Staphylococcus aureus</i> MS2	10 ⁻¹	4,9 x 10 ⁷
<i>Staphylococcus aureus</i> MR1	10 ⁻²	1,1 x 10 ⁷
<i>Staphylococcus aureus</i> MR2	10 ⁻¹	1,3 x 10 ⁷
<i>Staphylococcus aureus</i> A	10 ⁻²	3,4 x 10 ⁷
<i>Staphylococcus aureus</i> B	10 ⁻²	2,5 x 10 ⁷
<i>Staphylococcus aureus</i> C	10 ⁻²	1,5 x 10 ⁷
<i>Staphylococcus aureus</i> D	10 ⁻¹	3,2 x 10 ⁷
<i>Staphylococcus aureus</i> E	10 ⁻¹	3,5 x 10 ⁷
<i>Staphylococcus aureus</i> F	10 ⁻¹	5,8 x 10 ⁷
<i>Staphylococcus aureus</i> G	10 ⁻¹	3,9 x 10 ⁷
<i>Staphylococcus aureus</i> H	10 ⁻²	1,8 x 10 ⁷
<i>Staphylococcus aureus</i> M	10 ⁻¹	1,9 x 10 ⁷
<i>Staphylococcus aureus</i> O	10 ⁻¹	4,1 x 10 ⁷
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	10 ⁻¹	2,7 x 10 ⁷
<i>Streptococcus agalactiae</i> 1	10 ⁻¹	6,3 x 10 ⁷
<i>Streptococcus agalactiae</i> 2	10 ⁻²	1,4 x 10 ⁷
<i>Streptococcus agalactiae</i> 3	10 ⁻¹	5,9 x 10 ⁷
<i>Streptococcus agalactiae</i> A	10 ⁻¹	5,4 x 10 ⁷
<i>Streptococcus agalactiae</i> B	10 ⁻¹	7,6 x 10 ⁷
<i>Streptococcus agalactiae</i> C	10 ⁻¹	6,5 x 10 ⁷
<i>Streptococcus agalactiae</i> D	10 ⁻²	2,3 x 10 ⁷
<i>Streptococcus agalactiae</i> E	10 ⁻²	3,1 x 10 ⁷
<i>Streptococcus dysgalactiae</i> 1	10 ⁻¹	5,2 x 10 ⁷
<i>Streptococcus dysgalactiae</i> 2	10 ⁻¹	8,5 x 10 ⁷
<i>Streptococcus dysgalactiae</i> 3	10 ⁻¹	7,2 x 10 ⁷
<i>Streptococcus dysgalactiae</i> A	10 ⁻¹	7,4 x 10 ⁷
<i>Streptococcus uberis</i>	10 ⁻¹	3 x 10 ⁷
<i>Streptococcus uberis</i> A	10 ⁻¹	3,3 x 10 ⁷
<i>Streptococcus uberis</i> B	10 ⁻¹	2,5 x 10 ⁷
<i>Micrococcus luteus</i>	10 ⁻¹	5,9 x 10 ⁶
Cepas bacterianas Gram negativo	Dilución	UFC/mL
<i>Enterobacter</i> sp.	10 ⁻¹	1,9 x 10 ⁶
<i>Escherichia coli</i>	10 ⁻¹	2,4 x 10 ⁷
<i>Escherichia coli</i> A	10 ⁻¹	3,8 x 10 ⁶
<i>Escherichia coli</i> B	10 ⁻¹	4,6 x 10 ⁶
<i>Escherichia coli</i> C	10 ⁻¹	2,5 x 10 ⁷
<i>Escherichia coli</i> D	10 ⁻¹	4 x 10 ⁷
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10 ⁻¹	4,5 x 10 ⁷
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 1	10 ⁻¹	5,5 x 10 ⁶
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 2	10 ⁻¹	4,8 x 10 ⁶

5. Ensayos de evaluación de la actividad antibacteriana de la jalea real

5.1. Técnica de difusión en disco

Mediante esta metodología no se pudo evaluar la actividad antibacteriana de las muestras estudiadas debido a que no se observaron halos de inhibición del crecimiento en ninguna de las cuatro muestras de jalea real. Esto pudo ocurrir porque las diluciones de estas muestras no difundieron adecuadamente desde los discos embebidos con las correspondientes concentraciones debido a que la precipitación de sustancias insolubles en el agua absorbida por el disco evitó la difusión de sustancias antimicrobianas en el agar (Valgas y col., 2007). Otra causa podría haber sido porque todos los componentes activos de la jalea real no fueron totalmente absorbidos por los discos. De cualquier modo, en estos trabajos se concluye que esta técnica de difusión en discos no fue adecuada para ser utilizada para evaluar actividad antibacteriana de jalea real.

5.2. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) y de la concentración bactericida mínima (CBM) de jalea real por la técnica de dilución en tubo

En la Tabla 12 se resumen los resultados promedio de tres análisis de la CIM y de la CBM expresados en mg de jalea real por mL. Estos valores fueron obtenidos al evaluar la actividad antibacteriana de la JR R y de la JR NG, que fueron las únicas muestras de jalea real que se procesaron mediante esta técnica. Se utilizaron algunas de las cepas Gram positivo y negativo que habían sido aisladas de infecciones superficiales en seres humanos y de leche de vacas con mastitis como asimismo cepas procedentes de diversos orígenes y cepas de referencia.

Tabla 12: Actividad antibacteriana de JR R y JR NG por la técnica de dilución en tubo
(CIM/CBM: mg JR/mL, n=3)

Cepas Bacterianas	JR R CIM/CBM mg JR/mL	JR NG CIM/CBM mg JR/mL
<i>Enterococcus faecalis</i> 1*	5/-	13,7/-
<i>Micrococcus luteus</i> *	7,5/125	11,8/125
<i>Staphylococcus aureus</i> MS 1*	7,8/125	9/-
<i>Enterococcus faecalis</i> 2	3,7/-	7,6/125
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 2	3,3/250	14,4/62,5
<i>Staphylococcus aureus</i> MS 2	3,4/-	8,8/125
<i>Staphylococcus aureus</i> MR 1	8/125	14,5/125
<i>Staphylococcus aureus</i> MR 2	8/250	12,5/125
<i>Streptococcus uberis</i>	5,8/-	14,5/250
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	10,3/125	8,7/125
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 1	7,6/250	ND
<i>Escherichia coli</i>	7/-	7,1/-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	8,1/125	8/250

Nota: *Cepa de referencia; ND: No Determinado; (-): no bactericida

En general las dosis requeridas para impedir o inhibir el desarrollo o sea las dosis bacteriostáticas detectadas por la técnica de CIM no siempre han tenido correlación con aquellas necesarias para eliminar o matar a las bacterias según la CBM. Además se ha demostrado que algunos de los resultados obtenidos con las dos jaleas reales ensayadas por ambos métodos han diferido entre sí. A continuación se analizarán y comentarán en detalle estos resultados y sus posibles implicancias o aplicaciones prácticas.

Con respecto a la CIM de la JR R, mediante esta técnica se requirieron concentraciones correspondientes a un intervalo de 3,3 – 10,3 mg JR R/mL para inhibir el crecimiento de las bacterias ensayadas, siendo la cepa más sensible *P. aeruginosa* 2

y la más resistente *S. epidermidis*. Sin embargo cuando se realizó la CBM en estas mismas cepas se encontró que para *P. aeruginosa* 2 se requirió una mayor concentración para ejercer un efecto bactericida (250 mg JR R/mL) mientras que, por el contrario, se necesitó la mitad de la dosis de JR R para ejercer igual efecto sobre *S. epidermidis* (125 mg JR R/mL). Con respecto a las cepas *E. faecalis* 1 y 2 y *S. uberis*, si bien se necesitaron bajas concentraciones para inhibir su crecimiento (3,7 – 5,8 mg JR R/mL) ésta jalea no tuvo efecto bactericida sobre las mismas. De la misma manera, no se observó efecto bactericida sobre *E. coli* y *S. aureus* MS 2. Las bacterias más resistentes al efecto bactericida de JR R fueron las dos cepas de *P. aeruginosa* y *S. aureus* MR 2, ya que se necesitó de la concentración más alta estudiada (correspondiente al primer tubo de la serie: 250 mg JR R/mL) para eliminarlas.

Con respecto a la CIM de JR NG se requirieron mayores concentraciones de JR NG para inhibir el crecimiento bacteriano, cuando se la compara con la JR R. Así en JR NG se necesitó un intervalo de dosis más elevadas de 7,1 – 14,5 mg JR NG/mL. *E. coli* fue la cepa más sensible al efecto inhibitorio de JR NG y *S. aureus* MR 1 y *S. uberis* las más resistentes a tal efecto. En cuanto a la CBM, la concentración máxima de dicha muestra no fue suficiente para ejercer efecto bactericida sobre *E. coli*, y se necesitaron 250 mg JR NG/mL para ejercer efecto de muerte sobre *S. uberis* y *K. pneumoniae*. A diferencia de lo ocurrido con JR R, la JR NG tuvo efecto bactericida sobre *E. faecalis* 2, *S. aureus* MS 2 y *S. uberis*, En cambio, esta jalea no fue capaz de ejercer dicho efecto sobre *E. faecalis* 1, *S. aureus* MS 1 ni *E. coli*.

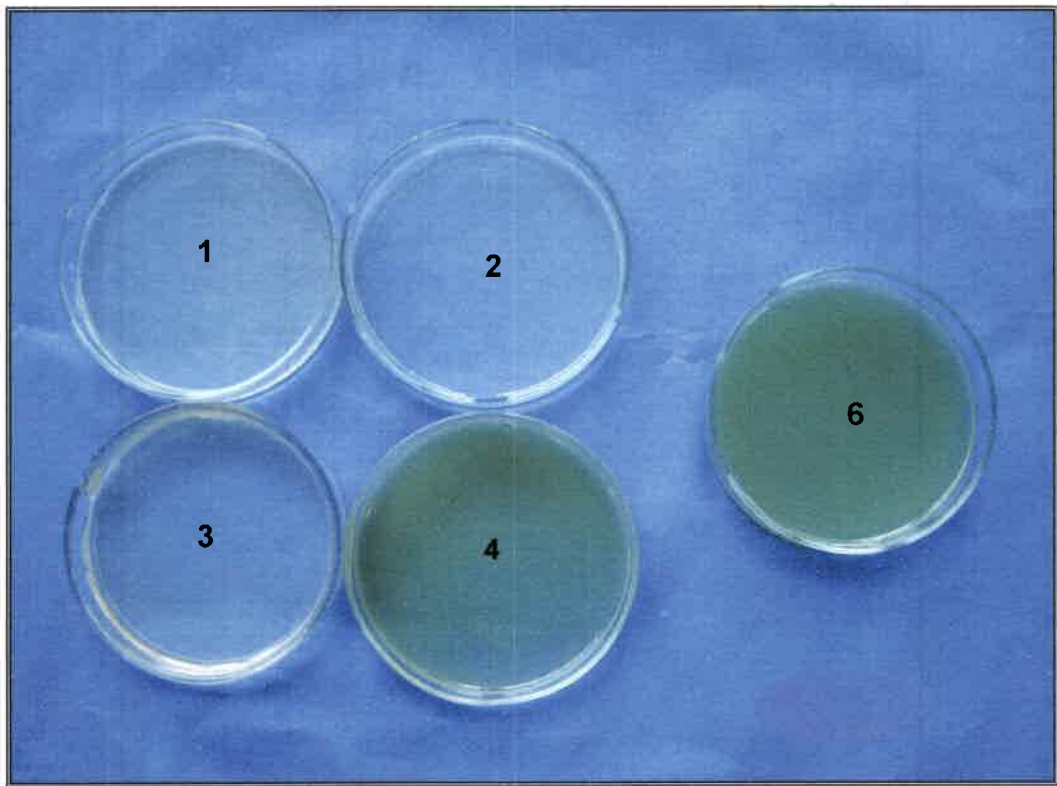


Figura 10: CBM de JR NG sobre *P. aeruginosa* 2

Referencias: Concentración de JR NG expresada en mg/mL: 1 (tubo 1): 250; 2 (tubo 2): 125; 3 (tubo 3): 62,5; 4 (tubo 4): 31,3; 6 (tubo 9): 0 (control de crecimiento bacteriano)

La cepa *P. aeruginosa* 2, aislada de infección por catéter, fue la cepa más sensible al efecto bactericida de JR NG, ya que se necesitaron bajas concentraciones de la misma para matarla (62,5 mg JR NG/ml: tubo 3) (Figura 10).

Muchos de los procedimientos utilizados en los hospitales quiebran la barrera cutánea; el más común de ellos es el uso de catéteres percutáneos. El uso de este tipo de dispositivos es cada vez más frecuente en medicina e incluye por ejemplo las guías venosas centrales, los catéteres para diálisis peritoneal, los tubos para drenar las cavidades corporales, entre otros. De hecho, el motivo más común del retiro prematuro de estos catéteres es una infección bacteriana, siendo *P. aeruginosa* la bacteria más comúnmente aislada aunque también pueden ser ocasionadas por otros bacilos Gram negativos, tales como *Klebsiella sp.* y *Serratia sp.* (Schaechter y col., 1994). Se ha publicado un trabajo relacionado con algunos de los datos obtenidos en esta Tesis sobre la posible acción de la jalea real para prevenir las bacterias causantes de infecciones cutáneas humanas (García y col., 2010). La piel puede ser infectada por microorganismos que se diseminan desde otro sitio infectado, ya sea por infección

directa desde un foco subyacente o a través del torrente circulatorio. Estas infecciones secundarias ocurren tanto en los huéspedes inmunocompetentes como en los inmunosuprimidos, pero con diferentes grados de incidencia y severidad. Como infecciones de este tipo también se describen los abscesos que fundamentalmente están ocasionados por *S. aureus* mientras que las necrosis de piel (estigma gangrenoso) suelen ser causadas *P. aeruginosa* (Schaechter y col., 1994).

Puede observarse que, para ambas muestras, existe una amplia diferencia entre las concentraciones de jalea real necesarias para inhibir el crecimiento de las cepas bacterianas estudiadas y las concentraciones de las muestras que se requieren para matarlas; por esto se puede decir que las muestras utilizadas demostraron efectos bacteriostáticos cuando se evaluaron por la técnica de dilución en tubo (García y col., 2010). Las diferencias observadas entre la JR R y la JR NG, con referencia a los valores de la CIM, y de la CBM, podrían estar relacionados a componentes de la jalea real asociados con su origen geográfico, o estar ligados a la variabilidad genética entre las colonias de abejas (Bachanová y col., 2002).

En la Figura 11 se detallan las concentraciones comparando las CIM de cada una de las bacterias ensayadas con ambas muestras de jalea real mediante la técnica de dilución en tubo. En este gráfico se puede observar claramente que son necesarias mayores concentraciones de JR NG respecto a la muestra JR R para inhibir a las bacterias estudiadas.

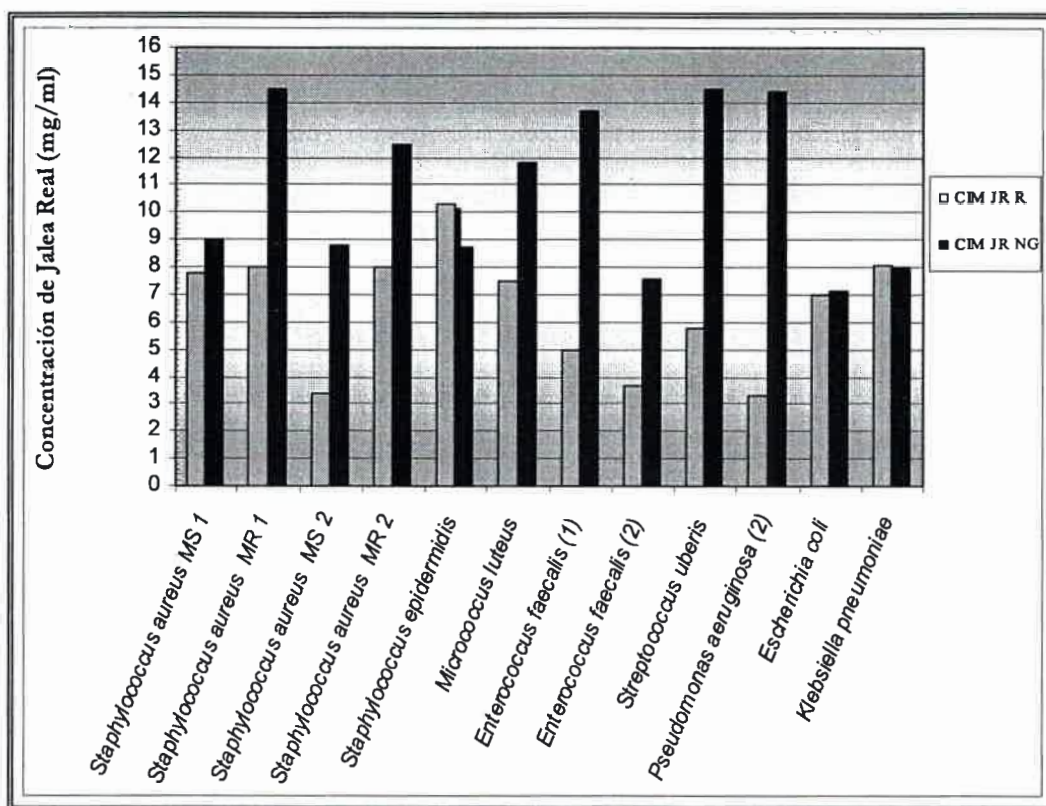


Figura 11: CIM de JR R y JR NG obtenida por la técnica de dilución en tubo

En la Figura 12 se comparan las CBM de las muestras JR R y JR NG sobre las bacterias estudiadas, obtenidas a partir de las placas sin crecimiento. Se puede observar que la actividad bactericida de la JR NG es levemente superior a la de JR R, debido a que ejerció dicho efecto sobre un mayor número de bacterias. La JR NG fue capaz de eliminar el 75% del total de las cepas estudiadas, en cambio JR R eliminó alrededor del 60% de las mismas. Además, en el gráfico se observa que fueron requeridas mayores concentraciones de ambas jaleas para eliminar a las bacterias Gram negativo con respecto a la necesaria para eliminar a las Gram positivo. No obstante, en el caso de *P. aeruginosa* 2 se observó una marcada diferencia entre la CBM obtenida con la aplicación de JR R y JR NG, siendo más efectiva ésta última; sólo se necesitaron 62,5 mg/mL de JR NG para causar un efecto bactericida completo a diferencia de los 250 mg/mL requeridos por la JR R. Como también se observa en el gráfico ninguna de las muestras ejerció efecto bactericida sobre *E. coli* ni *E. faecalis* 1. Sólo fueron eliminadas por JR NG las cepas *S. aureus* MS 2, *E. faecalis* 2 y *S. uberis*.

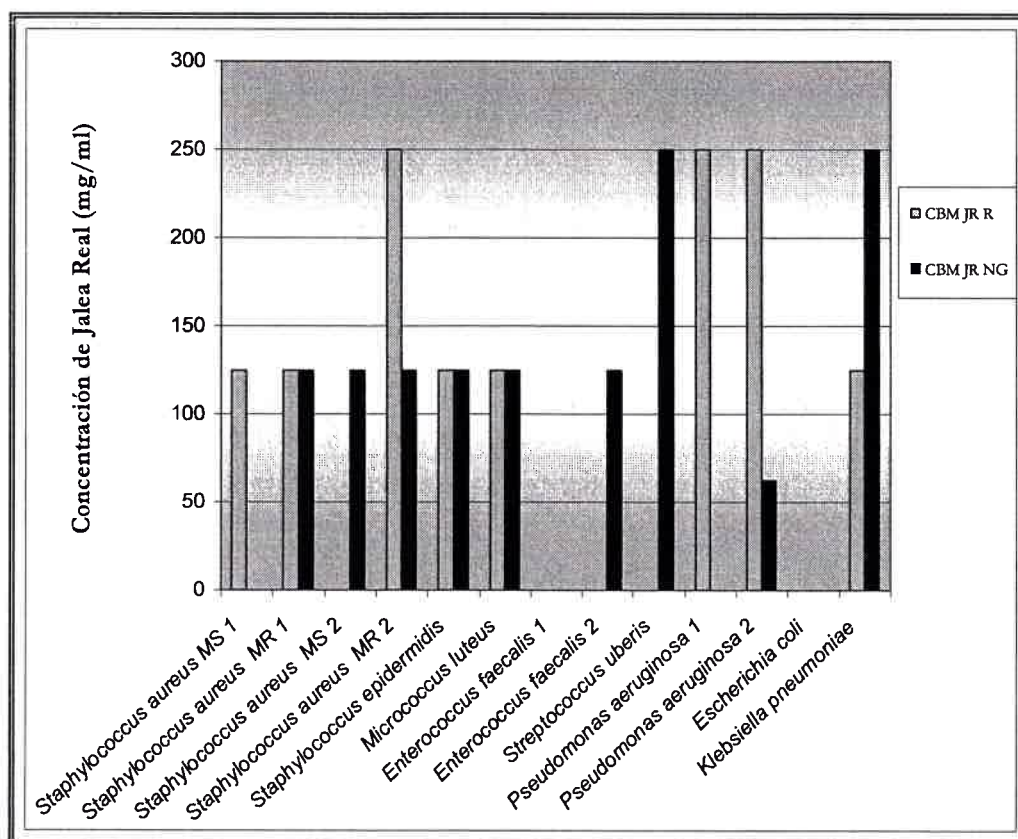


Figura 12: CBM de JR R y JR NG obtenida por la técnica de dilución en tubo

En la Figura 13 puede observarse un fotografía de las placas de Petri en donde la JR R ejerció un efecto bactericida a una concentración de 125 mg/mL sobre la cepa de *S. aureus* MS 1.

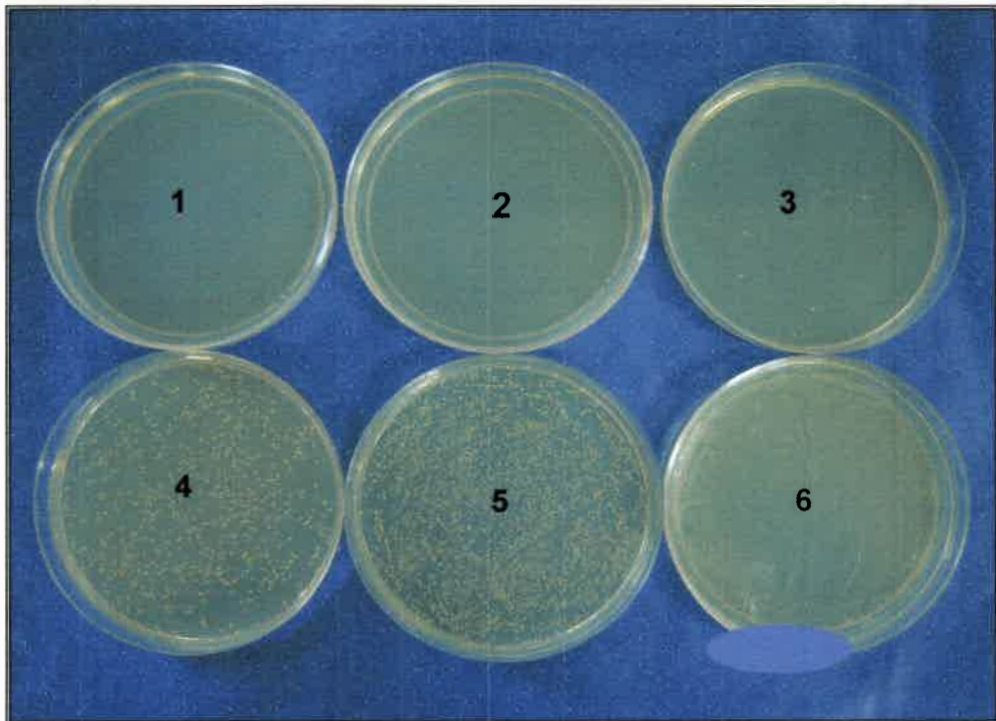


Figura 13: CBM de JR R sobre *S. aureus* MS 1

Referencias: Concentración de JR R expresada en mg/mL: 1 (tubo 1): 250; 2 (tubo 2): 125; 3 (tubo 3): 62,5; 4 (tubo 4): 31,3; 5 (tubo 5): 15,6; 6 (tubo 9): 0 (control de crecimiento bacteriano)

5.3. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de jalea real por la técnica de difusión en pozo

La Tabla 13 resume los datos promedio de tres ensayos que se obtuvieron midiendo los diámetros de los halos de inhibición del crecimiento en milímetros para las cepas estudiadas frente a JR R, expresados como porcentaje del peso de la jalea real/peso del agua (% p/p), considerando la densidad del agua de 1,0 g/mL. Las celdas sombreadas indican las CIM de cada una de las bacterias estudiadas.

Tabla 13: Actividad antibacteriana de JR R en % p/p por la técnica de difusión en pozo

Cepas Bacterianas	100	90	80	70	60	50	40	30	0
<i>E. faecalis</i> 1*	8,0 (0,0)	7,7 (0,6)	6,7 (0,6)	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>E. faecalis</i> 2	7,7 (0,6)	7,0 (0,0)	6,7 (0,6)	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>E. faecalis</i> 3	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>E. faecalis</i> 4	9,7 (0,6)	7,7 (0,6)	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>E. faecium</i>	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>S. aureus</i> MS 1*	14,7 (0,6)	12,7 (0,6)	12,3 (0,6)	8,7 (0,6)	6,7 (0,6)	NI	NI	NI	NI
<i>S. aureus</i> MS 2	17,0 (0,0)	14,7 (0,6)	14,0 (1,0)	9,7 (0,6)	7,0 (1,0)	NI	NI	NI	NI
<i>S. aureus</i> MR 1	13,7 (0,6)	11,7 (0,6)	11,0 (0,0)	8,7 (0,6)	NI	NI	NI	NI	NI
<i>S. aureus</i> MR 2	14,7 (0,6)	9,0 (0,0)	8,7 (0,6)	6,7 (0,6)	NI	NI	NI	NI	NI
<i>S. epidermidis</i>	12,0 (1,0)	6,7 (0,6)	8,7 (0,6)	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>S. agalactiae</i> 1*	8,7 (0,6)	8,0 (1,0)	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>S. agalactiae</i> 2	8,7 (0,6)	7,3 (0,6)	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>S. agalactiae</i> 3	8,7 (0,6)	8,0 (0,0)	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>S. dysgalactiae</i> 1*	11,3 (0,6)	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>S. dysgalactiae</i> 2	8,7 (0,6)	7,0 (0,0)	6,0 (0,0)	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>S. dysgalactiae</i> 3	11,3 (0,6)	10,3 (0,6)	8,7 (0,6)	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>S. uberis</i>	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>M. luteus</i> *	12,0 (0,0)	11,3 (0,6)	9,7 (0,6)	11,7 (0,6)	9,7 (0,6)	9,3 (0,6)	6,7 (0,6)	NI	NI
<i>E. coli</i>	8,0 (0,0)	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>K. pneumoniae</i>	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>P. aeruginosa</i> 1	6,0 (0,0)	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>P. aeruginosa</i> 2	6,0 (0,0)	6,7 (0,6)	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI

Nota: *: Cepa de referencia; NI: No Inhibe; 0: 0% de JR, sólo diluyente de la muestra
Los valores expresan el diámetro promedio de halos de inhibición del crecimiento y desvíos estándares (entre paréntesis) en milímetros.

Los halos de inhibición del crecimiento indican la actividad antibacteriana que la JR R posee frente a las diferentes especies bacterianas estudiadas. Algunas de las cepas Gram positivo que se estudiaron resultaron ser las más sensibles a la acción antimicrobiana de la JR R, dado que se observaron halos de inhibición del crecimiento en concentraciones bajas, de hasta el 40 % para la cepa de *M. luteus*. En general la actividad de JR R sobre las cepas Gram negativo fue mucho menor pues sólo resultaron ser sensibles frente a la muestra pura sin diluir (*E. coli* y *P. aeruginosa* 1), o a la muestra al 90 %, *P. aeruginosa* 2) o bien directamente fueron insensibles (*K. pneumoniae*). Estos hallazgos coinciden con los informados por otros investigadores quienes también describen una mayor actividad antibacteriana de jalea real sobre las bacterias Gram positivo con respecto a las Gram negativo (McCleskey y Melampy, 1939; Sauerwald y col., 1998). La cepa originaria de infección por catéter (*P. aeruginosa* 2) resultó ser la más sensible de las cepas Gram negativo estudiadas, ya que la CIM corresponde al 90 % de JR R.

Las cepas pertenecientes al género *Enterococcus*, aisladas de infecciones superficiales en seres humanos, en general fueron resistentes o poco sensibles observándose halos de inhibición del crecimiento de menor diámetro y CIM mayores (90-80 %). A diferencia de éstas, las bacterias del género *Staphylococcus* que se estudiaron, aisladas de leche de vacas que padecían mastitis fueron todas sensibles (70-60 %). Por otro lado, entre los aislamientos de mastitis bovina las cepas de *S. aureus* resultaron ser las más sensibles a la muestra JR R. Las cepas de *Streptococcus sp*, variaron siendo insensibles (*S. uberis*) o sensibles (80-100 %).

Con respecto a las cepas de *S. aureus* estudiadas, aquellas sensibles a meticilina resultaron ser también más sensibles a la JR R en comparación con las cepas meticilina resistentes, ya que en general para el caso de las primeras, se observaron halos de inhibición de mayor diámetro y fueron inhibidas en su crecimiento por concentraciones más bajas de JR R. *Staphylococcus aureus* es un patógeno común de la piel, capaz de provocar abscesos, shock tóxico y bacteriemia, y junto a *Streptococcus pyogenes* causan el 90% de las celulitis estreptocócicas (Schaechter y col., 1994). Las cepas de *S. aureus* sensibles y resistentes a meticilina son las principales cepas bacterianas Gram positivo involucradas en tratamientos difíciles de infecciones de piel (Halcón y Milkus, 2004). Como se reseñó en la introducción son escasos los informes referidos a

infecciones del ganado vacuno por cepas resistentes a la meticilina (SAMR) a pesar del papel considerable que tiene *S. aureus* como patógeno para la vaca productora de leche y el estrecho contacto entre personas y el ganado lechero (Scott Weese y van Duijkeren, 2010).

De todas las cepas estudiadas, se observa que *M. luteus* fue la más sensible a JR R, debido a que la CIM corresponde al 40% de JR R. En otros estudios se observaron resultados similares, donde *M. luteus* fue la más sensible a jalea real de doce bacterias comensales estudiadas (Stocker, 2003). Por el contrario, en estudios previos realizados en nuestro laboratorio, se demostró que diferentes muestras de miel no inhibieron el crecimiento de *M. luteus* ni de *E. faecalis* (Basualdo y col., 2007). Otros autores han demostrado una moderada inhibición del crecimiento de estas bacterias por diferentes extractos de plantas (Cao y col., 2009; Lim y col., 2009). Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la jalea real puede contener compuestos activos que no se encuentran presentes en la miel. Por ejemplo, la proteína royalisina fue identificada como un compuesto bactericida activo sobre bacterias Gram positivo, mientras que el 10-HDA posee actividad antibacteriana tanto sobre bacterias Gram positivo como Gram negativo. Estos compuestos se encuentran presentes generalmente en la jalea real (Fujiwara y col., 1990; Hornitzky, 1998; Melliou and Chinou, 2005), pero sólo la royalisina ha sido hallada en miel (Kwakman y col., 2010).

En la Tabla 14 se resumen los datos promedio de tres ensayos que se obtuvieron midiendo los diámetros de los halos de inhibición del crecimiento en milímetros para las cepas estudiadas frente a JR NG, expresados como porcentaje del peso de la jalea real/peso del agua (% p/p), considerando la densidad del agua de 1,0 g/mL. En esta Tabla las celdas sombreadas indican la CIM de cada una de las bacterias estudiadas.

Al evaluar los halos de inhibición del crecimiento de las diferentes bacterias ensayadas frente a la muestra JR NG, se observó una marcada acción antibacteriana de la misma. Al igual que lo que ocurrió para el caso de la JR R las bacterias Gram positivo fueron más sensibles a JR NG que las Gram negativo. De todas las cepas Gram negativo estudiadas, *E. coli* fue la más sensible, presentando halos de inhibición del crecimiento a concentraciones de JR NG de hasta el 60 %. La JR NG no ejerció actividad antibacteriana sobre *K. pneumoniae*.

Tabla 14: Actividad antibacteriana de JR NG en % p/p por la técnica de difusión en pozo

Cepas Bacterianas	100	90	80	70	60	50	40	30	20	10	0
<i>E. faecalis</i> 1*	12,3 (0,6)	9,7 (0,6)	9,0 (0,0)	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>E. faecalis</i> 2	11,3 (0,6)	7,7 (0,6)	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>E. faecalis</i> 3	11,3 (0,6)	8,7 (0,6)	8,7 (0,6)	6,7 (0,6)	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>E. faecalis</i> 4	14,0 (0,0)	9,7 (0,6)	9,0 (0,0)	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>E. faecium</i>	12,7 (0,6)	8,7 (0,6)	6,3 (0,6)	8,7 (0,6)	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>S. aureus</i> MS 1*	15,7 (0,6)	14,7 (0,6)	9,7 (0,6)	11,0 (0,0)	8,7 (0,6)	7,7 (0,6)	8,0 (0,0)	8,3 (0,6)	7,3 (0,6)	NI	NI
<i>S. aureus</i> MS 2	14,7 (0,6)	18,7 (0,6)	12,7 (0,6)	10,7 (0,6)	10,7 (0,6)	9,7 (0,6)	NI	NI	NI	NI	NI
<i>S. aureus</i> MR 1	11,7 (0,6)	9,3 (0,6)	10,7 (0,6)	6,7 (0,6)	7,0 (0,0)	7,0 (0,0)	6,0 (0,0)	NI	NI	NI	NI
<i>S. aureus</i> MR 2	20,7 (0,6)	18,7 (0,6)	19,7 (0,6)	12,7 (0,6)	9,0 (0,0)	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>S. epidermidis</i>	13,7 (0,6)	11,7 (0,6)	7,7 (0,6)	9,7 (0,6)	10,0 (0,0)	7,7 (0,6)	6,7 (0,6)	NI	NI	NI	NI
<i>S. agalactiae</i> 1*	8,7 (0,6)	9,7 (0,6)	8,7 (0,6)	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>S. agalactiae</i> 2	11,7 (0,6)	10,0 (0,0)	10,0 (0,0)	7,7 (0,6)	6,7 (0,6)	6,0 (0,0)	NI	NI	NI	NI	NI
<i>S. agalactiae</i> 3	11,3 (0,6)	10,7 (0,6)	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>S. dysgalactiae</i> 1*	8,7 (0,6)	10,3 (0,6)	9,0 (0,0)	10,3 (0,6)	8,7 (0,6)	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>S. dysgalactiae</i> 2	9,0 (0,0)	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>S. dysgalactiae</i> 3	11,7 (0,6)	9,7 (0,6)	7,0 (0,0)	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>S. uberis</i>	11,3 (0,6)	8,3 (0,6)	8,3 (0,6)	6,7 (0,6)	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>M. luteus</i> *	15,0 (0,0)	11,3 (0,6)	9,3 (0,6)	12,3 (0,6)	9,0 (0,0)	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>E. coli</i>	10,0 (0,0)	7,7 (0,6)	6,0 (0,0)	7,7 (0,6)	6,7 (0,6)	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>K. pneumoniae</i>	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>P. aeruginosa</i> 1	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>P. aeruginosa</i> 2	6,3 (0,6)	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI

Nota: *: Cepa de referencia; NI: No Inhibe; 0: 0% de JR, sólo diluyente de la muestra
Los valores expresan el diámetro promedio de halos de inhibición del crecimiento y desvíos estándares (entre paréntesis) en milímetros.

Es sabido que el modo de acción de los antimicrobianos depende, entre otros factores, del tipo de microorganismo y principalmente se relaciona con la estructura de la pared celular y de la membrana externa. Las bacterias Gram negativo, como por ejemplo *P. aeruginosa*, exhiben una resistencia intrínseca a una amplia variedad de agentes antimicrobianos naturales (Kalemba y Kunicka, 2003). La cepa aislada a partir de infección de piel debida a cateterismo (*P. aeruginosa* 2) mostró sensibilidad sólo en presencia de la JR NG sin diluir, mientras que *P. aeruginosa* aislada de agua de pozo (*P. aeruginosa* 1) resultó ser resistente a todas las concentraciones de JR NG ensayadas. La infección con *P. aeruginosa* constituye la más seria complicación en pacientes con quemaduras (Nasser y col., 2003; Altoparlak y col., 2005), seguida por infecciones con *K. pneumoniae*, *E. coli*, *S. aureus* y otros microorganismos patógenos (Nasser y col., 2003). Es necesario emprender estudios para determinar la actividad antibacteriana de productos naturales, como la jalea real, contra estos patógenos importantes. Se han realizado estudios de actividad antibacteriana sobre *P. aeruginosa* en los que se observa que el agregado de miel a la jalea real incrementa el efecto antibacteriano contra esta bacteria; demostrando un efecto sinérgico entre jalea real y miel sobre la cepa estudiada (Boukraâ y col., 2008). También la eficacia de la jalea real puede ser aumentada por un efecto sinérgico cuando es mezclada con almidón (Boukraâ y col., 2009).

De las cepas bacterianas pertenecientes al género *Streptococcus*, la cepa *S. agalactiae* 2 fue la más sensible a JR NG, ya que se observaron halos de inhibición del crecimiento hasta un 50 % de su concentración.

Aquellas cepas aisladas a partir de infecciones superficiales en seres humanos fueron más resistentes a la JR NG al compararse con las bacterias aisladas de mastitis bovina, debido a que se observaron, en general, mayores CIM. Los patógenos predominantes de infecciones de piel y tejidos blandos en pacientes hospitalizados incluyen, en primer lugar, *S. aureus* seguido por *P. aeruginosa*, *E. coli* y *Enterococcus sp.* (Dryden, 2009). Los enterococos son microorganismos comensales del tracto digestivo que, ocasionalmente, y sobre todo en pacientes inmunodeprimidos u hospitalizados durante largos períodos de tiempo, pueden comportarse como microorganismos patógenos. Los enterococos son uno de los principales patógenos nosocomiales. La prevalencia de enterococo como patógeno nosocomial ha aumentado debido a la selección de estos microorganismos en relación con el uso de antibióticos de

amplio espectro que no tienen actividad intrínseca frente a ellos (Conde-Estévez, 2010). Aunque forman parte de la flora normal de piel, aparato genito-urinario y gastrointestinal de los individuos sanos y no se les atribuye una elevada virulencia, en el ámbito hospitalario constituyen una de las causas más importantes de endocarditis, bacteriemia, infección urinaria e infección de heridas. Las dos especies principales causantes de infección enterocócica y aisladas con más frecuencia son *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*. (Maciá y col., 2005). Recientemente, se ha informado una alta prevalencia de *E. faecalis* como el principal agente etiológico de infecciones en implantes ortopédicos (Arciola y col., 2008).

De todas las cepas ensayadas, *S. aureus* MS 1 fue la bacteria más sensible a la JR NG, ya que se observaron halos de inhibición del crecimiento a bajas concentraciones de la muestra, correspondientes al 20 %, como se observa en la Figura 14. La cepa *S. aureus* MR 2 resultó ser la más sensible a JR NG al compararse con las cepas SAMS, debido a que se observaron halos de inhibición del crecimiento de mayor diámetro, aunque para ello se requirieron mayores concentraciones de la muestra (Figura 15).

Con respecto a *M. luteus* y *S. epidermidis* se observó un efecto antimicrobiano similar para ambas bacterias, aunque *S. epidermidis* resultó ser más sensible porque fue inhibida en presencia de menores concentraciones de JR NG (40 %). Casi todas las infecciones causadas por la bacteria oportunista *S. epidermidis* son adquiridas en el hospital, como resultado de la contaminación de un sitio quirúrgico por los microorganismos provenientes de la piel o nasofaringe del paciente o del personal del hospital. Producen infecciones purulentas en el sitio colonizado, por ejemplo en heridas postoperatorias (Vuong y Otto, 2002).

Aunque *M. luteus* es un microorganismo saprófito y forma parte de la microbiota normal de la piel, se han encontrado infecciones causadas por esta bacteria en personas que tienen su sistema inmunológico comprometido, como por ejemplo, pacientes con SIDA (Finelgold y Baron, 1992).



Figura 14: Actividad antibacteriana de JR NG por la técnica de difusión en pozo sobre *S. aureus* MS 1

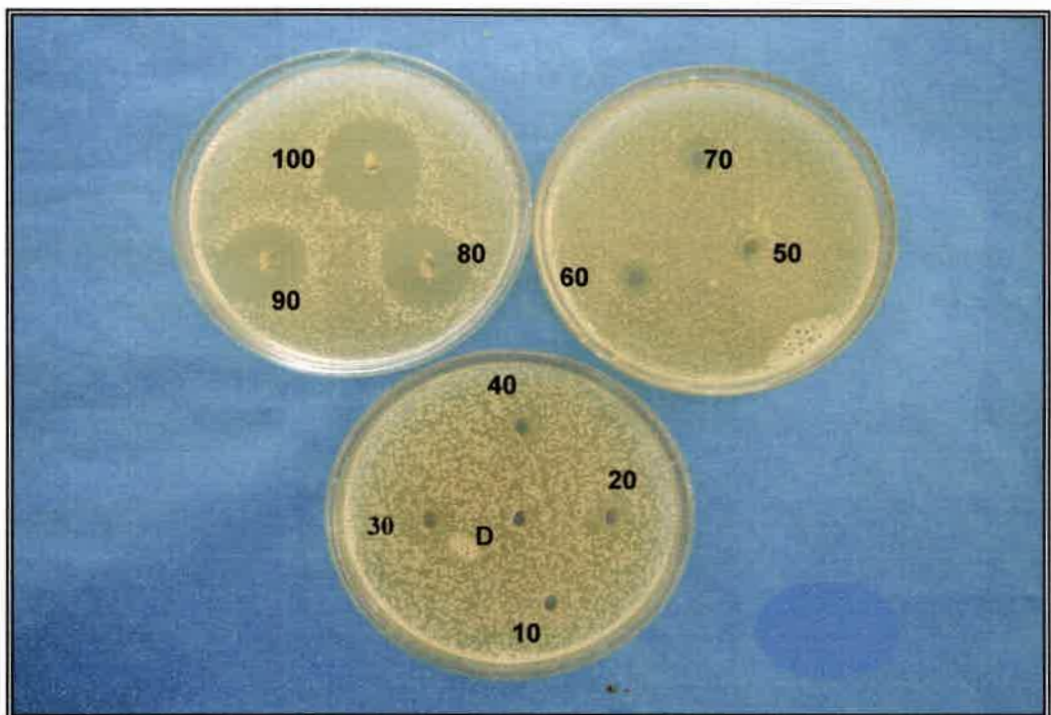


Figura 15: Actividad antibacteriana de JR NG por la técnica de difusión en pozo sobre *S. aureus* MR 2

Referencias: D: diluyente de la muestra (agua destilada estéril); 10; 20; 30; 40; 50; 60; 70; 80 y 90 representan la concentración de JR NG expresada en % p/p; 100: jalea real sin diluir (pura).

En la Tabla 15 se resumen los datos promedio de tres ensayos que se obtuvieron midiendo los diámetros de los halos de inhibición del crecimiento en milímetros para las cepas estudiadas frente a JR C, expresados como porcentaje del peso de la jalea real/peso del agua (% p/p), considerando la densidad del agua de 1,0 g/mL. En esta Tabla las celdas sombreadas indican la CIM de cada una de las bacterias estudiadas. Cabe aclarar que la muestra JR C fue la única que se utilizó sobre el total de las cepas bacterianas debido a su mayor disponibilidad.

Tabla 15: Actividad antibacteriana de JR C en % p/p por la técnica de difusión en pozo

Cepas Bacterianas	100	90	80	70	60	50	40	30	20	0
<i>E. faecalis</i> 1*	12,7 (0,6)	12,7 (0,6)	12,0 (0,0)	8,7 (0,6)	8,0 (0,0)	NI	NI	NI	NI	NI
<i>E. faecalis</i> 2	13,0 (0,0)	9,7 (0,6)	8,7 (0,6)	8,0 (0,0)	6,7 (0,6)	5,7 (0,6)	6,7 (0,6)	NI	NI	NI
<i>E. faecalis</i> 3	10,7 (0,6)	7,7 (0,6)	9,0 (0,0)	10,7 (0,6)	7,7 (0,6)	8,0 (0,0)	5,7 (0,6)	NI	NI	NI
<i>E. faecalis</i> 4	10,7 (0,6)	6,7 (0,69)	7,7 (0,6)	7,0 (0,0)	6,3 (0,6)	NI	NI	NI	NI	NI
<i>E. faecium</i>	11,3 (0,6)	9,3 (0,6)	10,0 (0,0)	6,7 (0,6)	7,7 (0,6)	7,3 (0,6)	NI	NI	NI	NI
<i>S. aureus</i> MS 1*	19,7 (0,6)	17,0 (1,0)	15,7 (0,6)	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>S. aureus</i> MS 2	14,7 (0,6)	15,0 (0,0)	15,3 (0,6)	12,7 (0,6)	10,7 (0,6)	6,0 (0,0)	6,7 (0,6)	NI	NI	NI
<i>S. aureus</i> MR 1	11,0 (0,0)	10,3 (0,6)	7,7 (0,6)	6,7 (0,6)	8,0 (0,0)	NI	NI	NI	NI	NI
<i>S. aureus</i> MR 2	27,7 (0,6)	28,0 (0,0)	21,7 (0,6)	26,0 (0,0)	26,0 (0,0)	18,7 (0,6)	15,7 (0,6)	9,7 (0,6)	NI	NI
<i>S. aureus</i> A	14,0 (1,0)	12,7 (0,6)	12,3 (0,6)	10,3 (0,6)	9,3 (0,6)	10,3 (0,6)	9,0 (1,0)	7,7 (0,6)	6,0 (0,0)	NI
<i>S. aureus</i> B	16,7 (0,6)	11,3 (0,6)	11,0 (0,0)	8,7 (0,6)	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>S. aureus</i> C	13,7 (0,6)	13,3 (0,6)	11,7 (0,6)	9,7 (0,6)	8,3 (0,6)	6,7 (1,2)	NI	NI	NI	NI
<i>S. aureus</i> D	14,7 (0,6)	12,7 (0,6)	10,0 (1,0)	9,3 (1,2)	9,3 (0,6)	7,3 (1,2)	6,3 (0,6)	6,0 (0,0)	NI	NI
<i>S. aureus</i> E	13,0 (1,0)	11,0 (1,0)	9,0 (0,0)	8,3 (0,6)	8,0 (0,0)	NI	NI	NI	NI	NI
<i>S. aureus</i> F	19,0 (1,0)	13,7 (0,6)	14,0 (0,0)	10,3 (0,69)	9,7 (0,6)	NI	NI	NI	NI	NI
<i>S. aureus</i> G	11,7 (0,6)	14,7 (0,6)	12,0 (0,0)	10,7 (0,6)	9,7 (0,6)	NI	NI	NI	NI	NI
<i>S. aureus</i> H	10,7 (0,6)	14,7 (0,6)	10,7 (0,6)	9,7 (0,6)	9,3 (1,2)	7,3 (0,6)	6,3 (0,6)	NI	NI	NI
<i>S. aureus</i> M	17,7 (0,6)	14,7 (0,6)	14,7 (0,6)	11,7 (0,6)	11,7 (0,6)	9,7 (0,6)	8,7 (0,6)	NI	NI	NI
<i>S. aureus</i> O	11,7 (0,6)	9,3 (0,6)	8,0 (1,0)	9,3 (1,2)	8,3 (1,2)	7,3 (0,6)	NI	NI	NI	NI

<i>S. epidermidis</i>	15,7 (0,6)	13,7 (0,6)	13,7 (0,6)	8,7 (0,6)	11,0 (0,0)	7,7 (0,6)	NI	NI	NI	NI
<i>S. agalactiae</i> 1*	11,0 (0,0)	11,7 (0,6)	10,7 (0,6)	10,7 (0,6)	8,7 (0,6)	7,7 (0,6)	NI	NI	NI	NI
<i>S. agalactiae</i> 2	9,7 (0,6)	9,3 (0,6)	7,3 (0,6)	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>S. agalactiae</i> 3	8,0 (0,0)	7,7 (0,6)	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>S. agalactiae</i> A	9,7 (0,6)	7,7 (1,2)	7,3 (0,6)	8,0 (0,0)	7,3 (0,6)	9,7 (0,6)	NI	NI	NI	NI
<i>S. agalactiae</i> B	12,7 (0,6)	10,7 (0,6)	10,7 (0,6)	10,0 (1,0)	7,7 (0,6)	6,7 (0,6)	NI	NI	NI	NI
<i>S. agalactiae</i> C	12,7 (0,6)	9,7 (0,6)	8,3 (0,6)	7,7 (0,6)	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>S. agalactiae</i> D	11,3 (0,6)	10,3 (0,6)	7,7 (0,6)	8,0 (0,0)	7,3 (0,6)	NI	NI	NI	NI	NI
<i>S. agalactiae</i> E	13,7 (0,6)	10,3 (0,6)	9,0 (0,0)	8,3 (0,6)	7,0 (0,0)	NI	NI	NI	NI	NI
<i>S. dysgalactiae</i> 1*	11,7 (0,6)	10,7 (0,6)	10,7 (0,6)	9,7 (0,6)	9,0 (0,0)	9,3 (0,6)	NI	NI	NI	NI
<i>S. dysgalactiae</i> 2	12,7 (0,6)	8,3 (0,6)	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>S. dysgalactiae</i> 3	10,3 (0,6)	9,0 (0,0)	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>S. dysgalactiae</i> A	11,7 (0,6)	10,3 (0,6)	10,3 (1,2)	7,3 (0,6)	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>S. uberis</i>	11,3 (0,6)	12,0 (0,0)	10,7 (0,6)	7,7 (0,6)	6,3 (0,6)	NI	NI	NI	NI	NI
<i>S. uberis</i> A	13,3 (1,2)	12,7 (0,6)	10,3 (0,6)	9,7 (0,6)	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>S. uberis</i> B	14,3 (0,6)	13,0 (0,0)	11,3 (0,6)	11,0 (1,0)	10,7 (0,6)	9,0 (1,0)	NI	NI	NI	NI
<i>M. luteus</i> *	15,7 (0,6)	13,3 (0,6)	13,0 (0,0)	10,7 (0,6)	9,7 (0,6)	8,7 (0,6)	NI	NI	NI	NI
<i>E. coli</i>	10,0 (0,0)	9,3 (0,6)	9,0 (0,0)	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>E. coli</i> A	8,3 (0,6)	8,0 (0,0)	7,0 (0,0)	6,7 (0,6)	7,0 (0,0)	NI	NI	NI	NI	NI
<i>E. coli</i> B	9,3 (0,6)	7,7 (0,6)	8,0 (0,0)	6,7 (0,6)	6,7 (0,6)	6,3 (0,6)	NI	NI	NI	NI
<i>E. coli</i> C	13,7 (0,6)	12,3 (1,5)	10,7 (0,6)	11,0 (0,0)	9,7 (0,6)	NI	NI	NI	NI	NI
<i>E. coli</i> D	14,3 (1,2)	11,7 (0,6)	12,0 (0,0)	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>Enterobacter</i> sp.	10,0 (0,0)	9,0 (1,0)	7,7 (0,6)	8,0 (0,0)	8,0 (1,0)	NI	NI	NI	NI	NI
<i>K. pneumoniae</i>	7,7 (0,6)	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>P. aeruginosa</i> 1	7,7 (0,6)	8,0 (0,0)	6,7 (0,6)	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>P. aeruginosa</i> 2	9,0 (0,0)	8,7 (0,6)	7,7 (0,6)	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI

Nota: *: Cepa de referencia; NI: No Inhibe; 0: 0% de JR, sólo diluyente de la muestra.
Los valores expresan el diámetro promedio de halos de inhibición del crecimiento y desvíos estándares (entre paréntesis) en milímetros.

Al evaluar los halos de inhibición del crecimiento de estas bacterias frente a la muestra JR C, en general se observó una marcada acción antibacteriana de la misma. Cabe destacar que todas las cepas bacterianas utilizadas resultaron sensibles a esta muestra, siendo las bacterias Gram positivo más sensibles que las Gram negativo, como ocurre con JR R y JR NG.

Las cepas de *Enterococcus* aisladas de infecciones superficiales en seres humanos fueron más resistentes a la JR C al compararse con las bacterias de *Staphylococcus* aisladas de leche de vacas con mastitis; este hecho se evidenció por tener los *Enterococcus*, halos de inhibición del crecimiento de menor diámetro. De los aislamientos obtenidos a partir de infecciones superficiales en seres humanos, las cepas *E. faecalis* 2 y 3 fueron las más sensibles, ya que con baja concentración de la JR C (40%) se consiguió un efecto inhibitorio en su crecimiento. La cepa *P. aeruginosa* 2 resultó la más resistente.

En cuanto a las bacterias Gram positivo aisladas de leche de vacas con mastitis, las cepas pertenecientes al género *Staphylococcus* generalmente fueron más sensibles que las cepas del género *Streptococcus*. Las primeras presentaron halos de inhibición del crecimiento de mayor diámetro y fueron sensibles a menores concentraciones de la JR C, oscilando los valores de las CIM entre el 70 % y el 20 %. Cabe destacar la susceptibilidad de la cepa *S. aureus* MR 2 a la muestra de JR C, la cual ejerció un fuerte efecto inhibitorio sobre la misma, observándose en esta bacteria los mayores halos de inhibición del crecimiento obtenidos tras la aplicación de la JR C, la que resultó activa inclusive a bajas concentraciones (30 %). Resultados similares se observaron sobre *S. aureus* MR 2, cuando se estudió el efecto de la JR NG. Esta marcada actividad antibacteriana de un producto natural como es la jalea real puede ser considerada de suma importancia considerando que esta bacteria ocasiona un serio problema en el tratamiento de heridas infectadas en humanos y animales (García y col., 2010; Scott Weese y van Duijkeren, 2010). Esta cepa bacteriana pertenece al grupo SAMR, quienes presentan, en general, resistencia múltiple a varios grupos de antibióticos. El interés actual del estudio de *S. aureus* se basa en que es el microorganismo representante de las cepas resistentes a meticilina. Sin embargo, debe destacarse que el término de “resistencia a meticilina” incluye resistencia a varios derivados β -lactámicos, y también, a través de diversos mecanismos, multiresistencia a cloranfenicol, tetraciclinas,

macrólidos, aminoglucósidos, e incluso, quinolonas, describiéndose cada vez con mayor frecuencia brotes de SAMR sensibles sólo a los glucopeptidos (Ito y col., 2001; Lowy, 1998). Este antibiótico fue introducido a la terapéutica en 1961 y fue la primera penicilina semi-sintética resistente a las penicilinasas (Lowy, 2003). Por lo tanto, el descubrimiento de la acción antimicrobiana de productos naturales tales como la jalea real, la miel, el propóleo y los extractos de plantas, que podrían ser utilizados solos o asociados con antibióticos de uso frecuente, es interesante debido a que la efectividad de estos antibióticos podría ser incrementada, minimizando de este modo la posibilidad de que seleccionen cepas resistentes (Basualdo y col., 2007; Lowy, 2003; Ratanavalachai y Wongchai, 2002; Sato y col., 2004; Sawaya y col., 2004). Se ha informado que diferentes muestras de miel producen, cuando se administran en bajas concentraciones, un efecto inhibitorio del crecimiento sobre cepas de *S. aureus* aisladas de heridas infectadas (Cooper y col., 1999).

Observando los valores de CIM, la cepa más sensible dentro de este género bacteriano fue *S. aureus* A, debido a que resultó inhibida a una menor concentración (20%). La cepa de *S. aureus* B fue la más resistente con una CIM de 70 %. La cepa de referencia (*S. aureus* MS 1) sólo fue inhibida en su crecimiento hasta una concentración del 80% de JR C, aunque se observaron halos de inhibición del crecimiento de mayor tamaño.

Con respecto a las bacterias del género *Streptococcus* procedentes de casos de mastitis bovina, se observaron halos de inhibición del crecimiento de menor tamaño mientras que los valores de las CIM estuvieron comprendidos entre el 70 % y el 50 %. Tres de las cepas analizadas (*S. agalactiae* A y B, y *S. uberis* B) fueron las más sensibles ya que resultaron inhibidas a una concentración de JR C correspondiente al 50%. Las cepas más resistentes fueron *S. agalactiae* 3 y *S. dysgalactiae* 2 y 3, con una CIM del 90 %. Sobre las cepas de referencia (*S. agalactiae* 1 y *S. 1*) se observaron halos de inhibición del crecimiento hasta un 50 % de la concentración de la JR C. La bacteria *S. agalactiae*, clasificada como estreptococo del grupo B, es un agente etiológico de la mastitis bovina mundialmente reconocido, causando tanto mastitis subclínica como clínica de larga duración (Dmitriev y col., 2002; Keefe, 1997). Las células bacterianas son transferidas en la leche de cuartos infectados a cuartos no infectados y a otras vacas por lo general durante el período de ordeño (Gruet y col.,

2001; Lammers y col., 2001). Al igual que *S. aureus*, *Corynebacterium bovis* y especies de *Mycoplasma*, *S. agalactiae* es un microorganismo patógeno infect-contagioso que vive y se multiplica dentro la glándula mamaria y sobre la piel del pezón. Todas estas bacterias se transmiten de animal a animal, principalmente durante el ordeño. Son además patógenos ambientales cuyo reservorio primario es el medio ambiente del tambo que es donde se hacinan las vacas. Constituyen un grupo heterogéneo de géneros y especies bacterianas, siendo los más frecuentemente aislados los estreptococos y las bacterias coliformes. Los estreptococos ambientales más prevalentes causantes de mastitis bovina son *S. uberis* y *S. dysgalactie*. Estas bacterias causan infección intramamaria cuando se dan condiciones favorables. Las bacterias del género *Streptococcus* pueden comportarse tanto como patógenos ambientales como infecto-contagiosos (Calvinho, 2007). A modo ilustrativo, en la Figura 16 se observa la actividad antibacteriana de JR C sobre *S. agalactiae* D por la técnica de difusión en pozo.

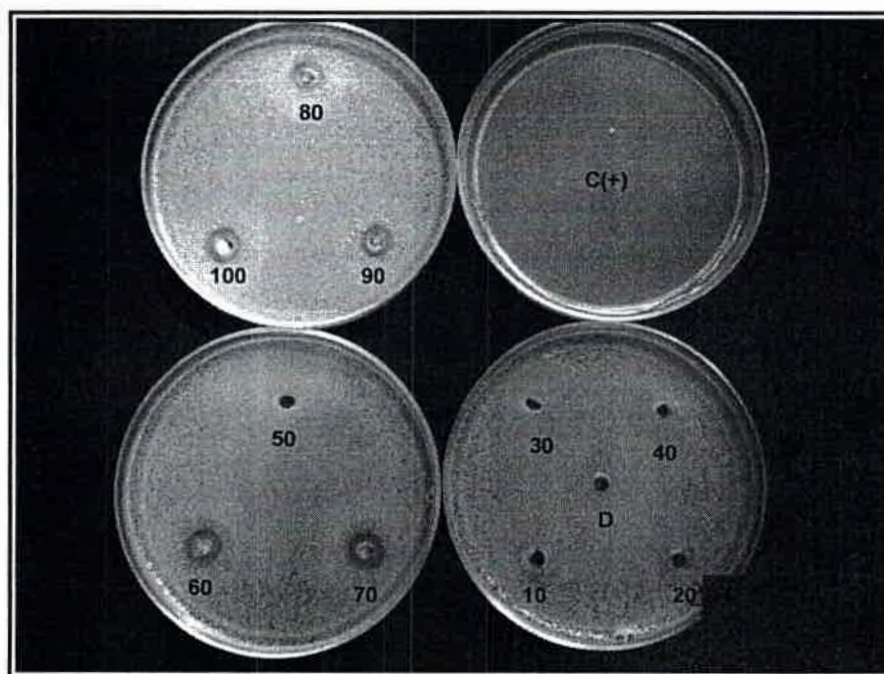


Figura 16: Actividad antibacteriana de JR C por la técnica de difusión en pozo sobre *S. agalactiae* D

Referencias: C(+): control positivo de crecimiento bacteriano; D: diluyente de la muestra (agua destilada estéril); 10; 20; 30; 40; 50; 60; 70; 80 y 90 representan la concentración de la JR C expresada en % p/p; 100: jalea real sin diluir (pura).

Además, fueron utilizadas cinco cepas Gram negativo pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, aisladas de casos de mastitis bovina (patógenos ambientales),

cuyos valores de CIM oscilaron entre un 50 % y un 80 % de JR C. La cepa más sensible fue *E. coli* B con una CIM correspondiente a 50 %, en cambio la cepa *E. coli* D fue la cepa más resistente con una CIM de 80 %. La alta incidencia de patógenos ambientales puede deberse, principalmente, a malas condiciones de higiene general (instalaciones y rutina), al igual que la no aplicación de selladores de pezón como medida preventiva de nuevas infecciones, lo cual incrementa considerablemente las probabilidades de contagio. Otro factor a tener en cuenta es la contaminación bacteriana del agua utilizada en todos los tambos para su rutina de trabajo, lo cual influye de manera significativa en la proliferación de estos microorganismos (Rivelli y Rodríguez, 2001). Entre las bacterias Gram negativo que pueden causar mastitis bovina existen dos grupos: los coliformes y los no coliformes. Con respecto a los primeros, *Citrobacter sp.*, *Enterobacter sp.*, *E. coli*, y *Klebsiella sp.* son responsables de aproximadamente la mitad de los casos de mastitis clínicas agudas mientras que, de los no coliformes, *Pseudomonas sp.* y *Serratia sp.* están más comunmente asociados con infecciones intramamarias (Hogan y Smith, 2003). Luego del parto, las infecciones con *E. coli* a menudo causan síntomas clínicos severos, acompañados por cambios en la composición de la leche debido a un extenso daño del tejido mamario (Burvenich y col., 2003; Vandeputte y col., 1993).

Comparando los resultados obtenidos con los diferentes géneros, especies y cepas bacterianas causantes de mastitis bovina que fueron ensayados en esta Tesis, se puede concluir que, en general, se presentó una gran variabilidad con respecto a sus CIM. Se observó también que las cepas pertenecientes al género *Staphylococcus* fueron más sensibles a la jalea real que los otros dos grupos analizados, ya que las CIM obtenidas por dicha especie bacteriana resultaron en un rango de 20-70 % y sus halos de inhibición fueron mayores que los observados en las cepas pertenecientes al género *Streptococcus* y a la familia *Enterobacteriaceae*. Este resultado es muy importante ya que la jalea real podría ser utilizada como tratamiento alternativo en las mastitis bovinas producidas por *S. aureus*, principal agente etiológico de la mastitis bovina (Fitzgerald y col., 2000). Las bacterias pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* presentaron mayor resistencia a la JR C, debido a que se observaron halos de inhibición del crecimiento de menor diámetro. Estos resultados son comparables con la multiresistencia frente a antibióticos utilizados en el tratamiento de mastitis bovina,

ocasionada por géneros de dicha familia (Bengtsson y col., 2009). Con respecto a aquellas cepas aisladas de diversos orígenes, *S. epidermidis* resultó ser la más sensible (CIM: 50 %) y *K. pneumoniae* la más resistente debido a que se requirió de la muestra pura sin diluir para ejercer sobre ella un efecto inhibitorio del crecimiento.

En la Tabla 16 se resumen los datos promedio de tres ensayos que se obtuvieron midiendo los diámetros de los halos de inhibición del crecimiento en milímetros para las cepas estudiadas frente a JR LP, expresados como porcentaje del peso de la jalea real/peso del agua (% p/p), considerando la densidad del agua de 1,0 g/mL. En esta Tabla las celdas sombreadas indican la CIM de cada una de las bacterias estudiadas.

Al evaluar los halos de inhibición del crecimiento de estas bacterias frente a la muestra JR LP, se observó acción antibacteriana de la misma. A diferencia de la muestra JR C, esta muestra no ejerció efecto inhibitorio sobre la totalidad de las cepas. En general, las bacterias Gram positivo resultaron más sensibles que las Gram negativo, observándose para el caso de las primeras halos de inhibición del crecimiento de mayor tamaño y CIM menores.

Las bacterias aisladas de infecciones superficiales mostraron sensibilidad a la JR LP, siendo *E. faecalis* 4 y *E. faecium* las cepas más sensibles ya que con baja concentración de la muestra (50 %) se consiguió un efecto inhibitorio en su crecimiento. Sin embargo, la cepa *E. faecalis* 2 fue la más resistente de dichos aislamientos, ya que sólo fue inhibida en presencia de la muestra pura (100 %). Por otra parte, las susceptibilidades de *E. faecalis* 1 (cepa de referencia) y *E. faecalis* 3 fueron similares; ambas mostraron halos de inhibición del crecimiento hasta un 80 % de JR LP. La cepa *P. aeruginosa* 2 fue inhibida en su crecimiento por la muestra JR LP hasta una concentración del 60 %. Este resultado es muy importante sobre todo si se tiene en cuenta que *P. aeruginosa* es la causa más común de muerte entre humanos por las septicemias originadas a partir de heridas causadas por quemaduras. Además, un problema común en los hospitales es el aislamiento de muchas de estas cepas, que resultan multiresistentes a los antibióticos.

Tabla 16: Actividad antibacteriana de JR LP en % p/p por la técnica de difusión en pozo

Cepas Bacterianas	100	90	80	70	60	50	40	30	0
<i>E. faecalis</i> 1*	12,0 (0,0)	10,7 (0,6)	8,7 (0,6)	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>E. faecalis</i> 2	10,3 (0,6)	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>E. faecalis</i> 3	13,7 (0,6)	13,7 (0,6)	11,7 (0,6)	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>E. faecalis</i> 4	10,7 (0,6)	10,0 (0,0)	9,0 (0,0)	10,0 (0,0)	10,0 (1,0)	8,7 (0,6)	NI	NI	NI
<i>E. faecium</i>	9,7 (0,6)	7,7 (0,6)	7,0 (0,0)	7,7 (0,6)	6,7 (0,6)	6,7 (0,6)	NI	NI	NI
<i>S. aureus</i> MS 1*	18,7 (0,6)	16,7 (0,6)	17,0 (0,0)	15,7 (0,6)	13,7 (0,6)	10,7 (0,6)	NI	NI	NI
<i>S. aureus</i> MS 2	11,7 (0,6)	12,0 (0,0)	7,7 (0,6)	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>S. aureus</i> MR 1	12,7 (0,6)	9,7 (0,6)	8,7 (0,6)	9,0 (0,0)	NI	NI	NI	NI	NI
<i>S. aureus</i> MR 2	18,7 (0,6)	17,0 (1,0)	15,0 (1,0)	16,7 (0,6)	16,7 (0,6)	NI	NI	NI	NI
<i>S. epidermidis</i>	10,7 (0,6)	12,7 (0,6)	12,0 (0,0)	10,0 (0,0)	8,7 (0,6)	6,3 (0,6)	NI	NI	NI
<i>S. agalactiae</i> 1*	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>S. agalactiae</i> 2	10,7 (0,6)	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>S. agalactiae</i> 3	10,7 (0,6)	9,0 (1,0)	8,7 (0,6)	6,7 (0,6)	NI	NI	NI	NI	NI
<i>S. dysgalactiae</i> 1*	9,7 (0,6)	8,3 (0,6)	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>S. dysgalactiae</i> 2	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>S. dysgalactiae</i> 3	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>S. uberis</i>	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>M. luteus</i> *	10,7 (0,6)	10,0 (0,0)	8,3 (0,6)	6,7 (0,6)	6,0 (0,0)	NI	NI	NI	NI
<i>E. coli</i>	10,0 (0,0)	10,3 (0,6)	8,7 (0,6)	6,7 (0,6)	NI	NI	NI	NI	NI
<i>K. pneumoniae</i>	8,7 (0,6)	8,0 (0,0)	7,7 (0,6)	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>P. aeruginosa</i> 1	8,0 (0,0)	6,7 (0,6)	6,7 (0,6)	6,0 (0,0)	NI	NI	NI	NI	NI
<i>P. aeruginosa</i> 2	6,7 (0,6)	6,0 (0,0)	6,3 (0,6)	6,7 (0,6)	6,0 (0,0)	NI	NI	NI	NI

Nota: *: Cepa de referencia; NI: No Inhibe; 0: 0% de JR, sólo diluyente de la muestra.

Los valores expresan el diámetro promedio de halos de inhibición del crecimiento y desvíos estándares (entre paréntesis) en milímetros.

Con un creciente interés en el uso de terapias alternativas y el desarrollo de bacterias cada vez más resistentes a los antibióticos, la combinación de miel y jalea real

podría utilizarse como tratamiento en las heridas causadas por quemaduras. Si bien ambos productos de la colmena son individualmente eficaces contra las bacterias, se pudo demostrar que la adición de miel a jalea real aumenta el efecto antibacteriano contra cepas de *P. aeruginosa*, aisladas de heridas causadas por quemaduras (Boukraâ, 2008). Por lo tanto, se observó que la presencia en miel de cantidades relativamente pequeñas de ácidos grasos de jalea real con actividad antibacteriana, puede ejercer efectos aditivos y sinérgicos con el peróxido de hidrógeno, con otros ácidos grasos antibacterianos (por ejemplo, ácido fórmico, ácido oxálico y otros ácidos de bajo peso molecular), así como con los compuestos fenólicos que se encuentran en la miel (Boukraâ y col., 2008).

Con respecto a las bacterias aisladas de mastitis bovina, las cepas pertenecientes al género *Staphylococcus* fueron más sensibles que las del género *Streptococcus*, ya que presentaron halos de inhibición del crecimiento de mayor diámetro y fueron sensibles a menores concentraciones de la muestra (hasta un 60 %). Uno de los agentes causales de la mastitis bovina es *S. aureus*, junto a *S. agalactiae* y *S. uberis*, entre otros. También han sido aisladas de mastitis bovina cepas de SAMR (Douglas y col, 2000; Prescott y Desmond, 1988; Soca Pérez y col., 2005). Al igual que lo observado con las muestras JR NG y JR C, la cepa *S. aureus* MR 2 mostró mayor sensibilidad a la JR LP comparada con el resto de los aislamientos de dicho género bacteriano que provenían de casos de mastitis bovina. La muestra resultó activa sobre *S. aureus* MR 2 hasta una concentración del 60 %, observándose halos de inhibición del crecimiento de mayor tamaño (Figura 17). Por el contrario, *S. aureus* MS 2 presentó mayor resistencia a la muestra JR LP, ya que la misma fue capaz de inhibirla sólo hasta un 80 %. La cepa de referencia *S. aureus* MS 1 y *S. epidermidis* resultaron ser las más sensibles de dicho género bacteriano, cuya CIM fue del 50 % de la JR LP, aunque se observó mayor sensibilidad para el caso de *S. aureus* MS 1 debido a que se obtuvieron halos de inhibición del crecimiento de mayor diámetro.

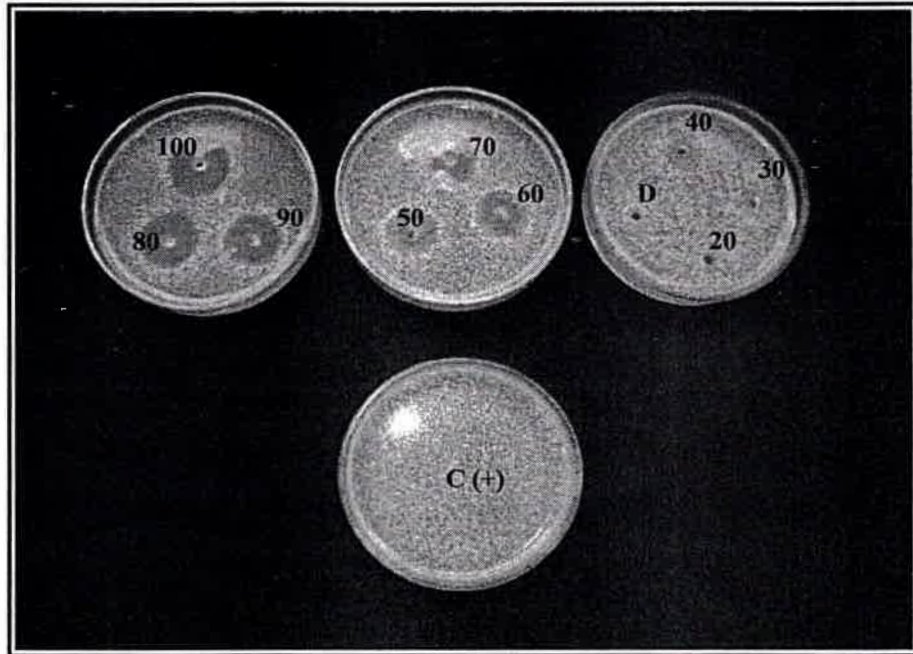


Figura 17: Actividad antibacteriana de JR LP por técnica de difusión en pozo sobre *S. aureus* MR 2

Referencias: C(+): control positivo de crecimiento bacteriano; D: diluyente de la muestra (agua destilada estéril); 20; 30; 40; 50; 60; 70; 80 y 90 representan la concentración de la JR C expresada en % p/p; 100: jalea real sin diluir (pura).

Las cepas de *Streptococcus* mostraron mayor resistencia a la JR LP debido a que cuatro de ellas no fueron inhibidas en su crecimiento en ninguna de las concentraciones que fueron probadas. Así, las cepas *S. uberis* y *S. dysgalactiae* 2 y 3 como también la cepa de referencia *S. agalactiae* 1, resultaron ser totalmente resistentes a la JR LP, ya que no se observaron halos de inhibición de su crecimiento en ninguna de las diluciones ensayadas de JR LP, inclusive cuando se usó la JR LP sin diluir. La bacteria *S. uberis* es un microorganismo ambiental que se comporta como patógeno oportunista que comúnmente causa mastitis bovina, siendo la principal causa de reinfección durante los períodos de sequía. Además, este microorganismo es el más resistente a los antibióticos cuando se lo compara con otras especies del género *Streptococcus*, tales como *S. agalactiae* y *S. dysgalactiae* (Guérin-Faubleé y col., 2002). De las cepas bacterianas del género *Streptococcus* estudiadas, la cepa de *S. agalactiae* 3 fue la más sensible a la JR LP, ya que se observó actividad antibacteriana hasta el 70 %. Por otra parte, *S. agalactiae* 2 solo pudo ser inhibida por la muestra de JR LP sin diluir.

La actividad antibacteriana de las muestras de jalea real estudiadas sobre *P. aeruginosa* podría ser de importancia en el desarrollo de ungüentos para el tratamiento de heridas, debido a que esta bacteria se encuentra frecuentemente en personas con heridas de piel, particularmente en aquellas relacionadas con quemaduras (Abdelatif y col., 2008). Además, resulta interesante la actividad antibacteriana de jalea real sobre las cepas de *E coli* y sobre *K. pneumoniae*. Esta bacteria puede causar neumonía, pero, más a menudo, está vinculada con enfermedades del tracto urinario y con infecciones de heridas adquiridas por contaminación del medio ambiente, especialmente en individuos inmunosuprimidos. La virulencia de estas cepas se incrementa y las infecciones intrahospitalarias aumentan debido a la creciente aparición de cepas resistentes a los antibióticos, especialmente a los antibióticos β -lactámicos debido a que *K. pneumoniae* es un productor de beta lactamasas (Gaitán y Espinal Marín, 2009; Martínez Ramos y col., 2005).

5.3.1. Análisis estadístico

La interacción entre el grupo bacteriano y el lugar de procedencia de la muestra resultó no significativa ($p > 0,05$), lo cual indica que en las cuatro muestras se observan las mismas diferencias entre los grupos bacterianos. Por otro lado, los factores grupo bacteriano y procedencia de la muestra resultaron ambos significativos ($p < 0,05$) lo cual denota que hay diferencias estadísticamente significativas entre los grupos bacterianos y también entre los lugares de procedencia.

En la Tabla 17 se observan las CIM promedio que fueron obtenidas a partir de las CIM de las cuatro muestras de jalea real sobre todas las cepas en cada uno de los grupos bacterianos.

Tabla 17: CIM promedio y desvíos estándares para cada grupo bacteriano, incluyendo las cuatro muestras. (Letras diferentes “a” o “b” indican diferencias estadísticamente significativas)

Grupo Bacteriano	<i>Staphylococcus sp.</i>	<i>Enterococcus sp.</i>	<i>Streptococcus sp.</i>	Gram negativo
Media (% p/p)	53,3 a	69,5 b	74,5 b	76,7 b
Desvío estándar (% p/p)	16,5	18	16,9	16,5

A partir del test *a posteriori* de Tukey se puede concluir que el grupo *Staphylococcus sp.* fue el más sensible (a) con respecto a los otros tres grupos, no habiendo diferencias significativas entre ellos (b) (*Enterococcus sp.*, *Streptococcus sp.* y bacterias Gram negativo, independientemente del lugar de procedencia de la jalea real (Figura 18).

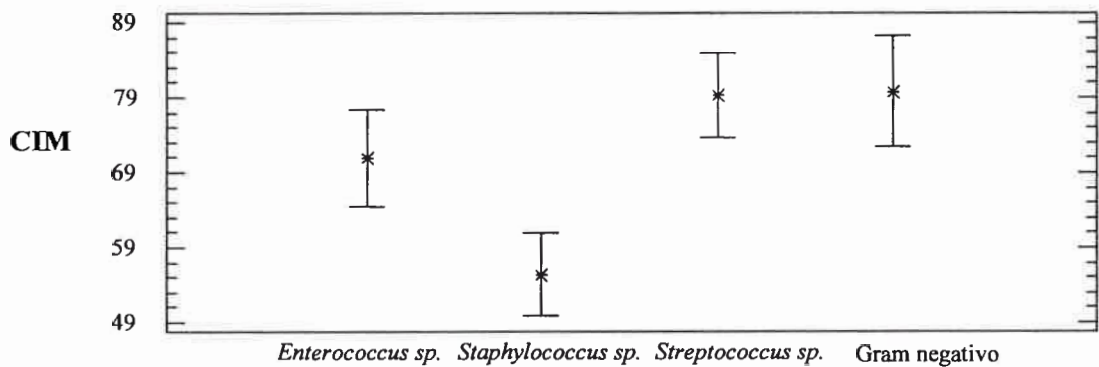


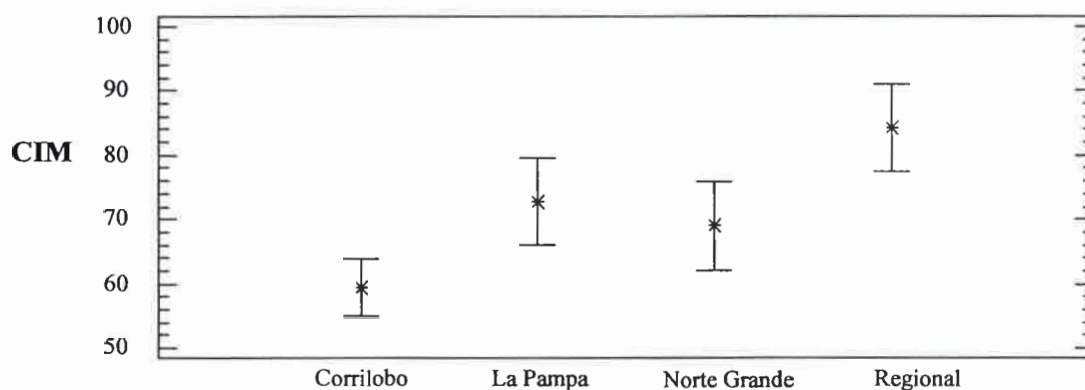
Figura 18: CIM promedio de las cuatro muestras para cada grupo bacteriano e intervalo de confianza de Tukey

En la Tabla 18 se muestran las CIM promedio (incluyendo los cuatro grupo bacterianos) de los cuatro lugares de procedencia de las muestras de jalea real.

Tabla 18: CIM promedio y desvíos estándares para cada muestra, incluyendo los cuatro grupos bacterianos. (Letras diferentes “a” o “b” indican diferencias estadísticamente significativas)

Muestra	Corrilobo	Norte Grande	La Pampa	Regional
Media (% p/p)	59,8 a	67,9 ab	71,2 bc	82,9 c
Desvío estándar (% p/p)	17,7	21,5	16,5	12,6

A partir del test *a posteriori* de Tukey se puede concluir que las muestras de Corrilobo y de Norte Grande fueron las que tuvieron en promedio menor CIM, no habiendo diferencias estadísticamente significativas entre ellas (a), mientras que las muestras de La Pampa y Regional tuvieron en promedio la mayor CIM siendo la diferencia entre ellas estadísticamente no significativa (c). Además las muestras de La Pampa y de Norte Grande no presentaron diferencias significativas (b). Por otro lado, las muestras de Norte Grande y Regional, de Corrilobo y Regional y de Corrilobo y La Pampa presentaron diferencias significativas una con otra (letras diferentes entre ellas) (Figura 19).

**Figura 19:** CIM promedio de los cuatro grupos bacterianos para cada muestra e intervalo de confianza de Tukey

En un estudio sobre la actividad antimicrobiana que fue realizado con muestras de jalea real procedentes de diferentes orígenes geográficos de Turquía (Stocker, 2003), se pudo confirmar que existieron variaciones entre las muestras recolectadas en distintas áreas. Considerando que la sensibilidad de las bacterias a los productos apícolas varía

considerablemente con el tipo de producto y su variedad (Boukraâ y Sulaiman, 2009), las diferencias detectadas en esta tesis entre las muestras de Corrilobo y Regional, entre las muestras de Corrilobo y La Pampa, y entre las muestras de Norte Grande y Regional, (letras diferentes en Tabla 18), podrían ser explicadas por el hecho de que proceden de diferentes regiones geográficas de la Argentina.

Estos resultados de actividad antibacteriana, empleando la técnica de difusión en pozo, indican que las muestras de jalea real que se estudiaron en esta Tesis y que se obtuvieron de diferentes regiones de la Argentina poseen un amplio efecto inhibitorio sobre cepas procedentes de diversos orígenes, tales como aquellas causantes de infecciones superficiales en seres humanos, mastitis en bovinos y aislamientos de bacterias Gram negativo a partir de muestras de agua, catéter intravenoso y compostaje de aves. Además, por medio de la aplicación de esta metodología, fue posible obtener las CIM de las muestras de jalea real correspondientes a cada cepa bacteriana en particular. En coincidencia con los resultados de esta Tesis, en otros estudios también se observó una mayor sensibilidad de la técnica de difusión en pozo en comparación con la de difusión en disco, al evaluar la actividad antibacteriana de extractos de productos naturales. Estos estudios consideran que, utilizando la técnica de difusión en pozo es mucho menos probable que la composición de las mezclas complejas de productos solubles e insolubles en la muestra que se evalúa interfieran con la transferencia o difusión de la sustancia antimicrobiana en el agar, tal como ocurre en la técnica de difusión en disco (Valgas y col., 2007).

5.4. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de jalea real por la técnica de microdilución en caldo

Para evaluar la utilización de ésta metodología en el estudio de actividad antibacteriana de jalea real se utilizó la muestra JR C enfrentándola con algunas de las cepas, tanto Gram positivo como Gram negativo. Se seleccionaron aquellas cepas que resultaron ser las más sensibles a la acción antibacteriana de la JR C cuando anteriormente habían sido evaluadas por la técnica de difusión en pozo. Además se incluyeron cepas de referencia.

Se preparó una solución madre de la JR C en agua destilada estéril con una concentración de 500 mg/mL (solución que a esa concentración fue incapaz de reducir *per se* al indicador TTC). Se evaluaron concentraciones diluidas en base \log_2 de la JR C partiendo desde 50 mg/mL hasta 0,1 mg/mL, las cuales se ubicaron en los pocillos 1 (solución madre) y en los pocillos 2 a 10 desde las diluciones $\frac{1}{2}$ hasta $\frac{1}{512}$. En las filas A, B y C de la microplaca se evaluó la actividad antibacteriana de una cepa bacteriana, en las filas D, E y F la actividad sobre una segunda cepa; en las filas G y H se colocaron los correspondientes controles negativos. Luego de la incubación, se obtuvieron las CIM de cada una de las bacterias ensayadas, registradas como el último pocillo en el cual no se observó coloración rosada, que es donde no hubo desarrollo bacteriano y por lo tanto fue donde las bacterias fueron incapaces de reducir el TTC a formazán de color rojizo. Es importante destacar que, en todos los casos, se obtuvieron los mismos resultados, o sea un mismo valor de la CIM para las tres determinaciones que fueron realizadas en cada una de las cepas. Además, no se observó ningún cambio de coloración en los pocillos de las filas G y H, correspondientes a los controles negativos (diluciones de la muestra sin la incorporación del inóculo bacteriano).

Cabe aclarar que al comienzo de los trabajos de la presente Tesis esta metodología debió ser puesta a punto y en los primeros ensayos se utilizó como indicador de crecimiento bacteriano a la resazurina, pero luego se observó que todas las diluciones de la jalea real reducían *per se* a dicho indicador, impidiendo de ese modo la visualización del efecto inhibitorio; por lo tanto la resazurina no fue utilizada como indicador y fue reemplazada por el TTC.

En la Tabla 19 se muestran los resultados obtenidos indicando la CIM de JR C sobre las cepas bacterianas ensayadas por la técnica de microdilución en caldo. Se observa que, a excepción de *P. aeruginosa* 1, todas las demás cepas estudiadas fueron sensibles a la JR C. Al igual que lo observado en la técnica de difusión en pozo, de todas las cepas ensayadas, las más sensibles fueron *Enterococcus faecalis* 2, cepa que fue aislada de infección de tobillo humano y *S. aureus* MR 2 y *S. uberis*, ambas aisladas de infecciones de leche de vacas con mastitis.

Tabla 19: Actividad antibacteriana de JR C por la técnica de microdilución en caldo (CIM: mg JR/mL, n = 3)

Cepas Bacterianas	CIM (mg/mL)
<i>Enterococcus faecalis</i> 2	12,5
<i>Staphylococcus aureus</i> MS 1*	25
<i>Staphylococcus aureus</i> MS 2	25
<i>Staphylococcus aureus</i> MR 1	25
<i>Staphylococcus aureus</i> MR 2	12,5
<i>Streptococcus agalactiae</i> 1*	25
<i>Streptococcus dysgalactiae</i> 1*	25
<i>Streptococcus uberis</i>	12,5
<i>Escherichia coli</i> B	50
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 1	NI

Del análisis de estos resultados se puede concluir que la técnica de microdilución en caldo empleando TTC como indicador, puede ser utilizada y es apropiada para evaluar la actividad antibacteriana de las muestras de jalea real. Es por ello que, una vez puesta a punto esta técnica, la misma se empleó para realizar los estudios de actividad antibacteriana de la fracción lipídica activa de JR C como se verá más adelante, en el punto 8 de esta sección.

De los resultados de esta Tesis y de los trabajos de otros autores (Stocker, 2003; Yatsunami y Echigo, 1985) se concluye que debido a las propiedades antibióticas de la jalea real, este producto natural podría tener un amplio uso en apiterapia.

En la Figura 20 se muestra la microplaca en donde se realizó el ensayo para determinar la actividad antibacteriana de la JR C mediante la técnica de microdilución en caldo sobre las cepas *Staphylococcus aureus* MS 1 (filas A, B y C) y *Staphylococcus aureus* MS 2 (filas D, E y F). Como puede verse en esta fotografía, la CIM de ambas cepas bacterianas se visualiza claramente en el pocillo 2, que es la última dilución de la jalea real en la cual se observa ausencia de coloración rosada o rojiza.

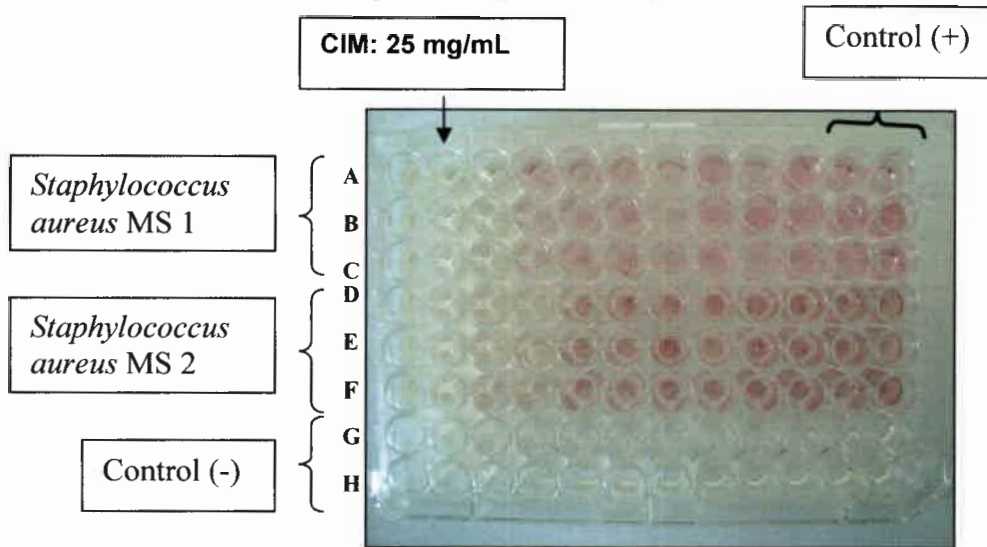


Figura 20: Actividad antibacteriana de JR C sobre *S. aureus* MS 1 y *S. aureus* MS 2 por la técnica de microdilución en caldo

6. Ensayos de actividad antibacteriana de extractos etéreos (EE) y extractos desgrasados (ED) de jalea real por la técnica de difusión en pozo

Para la realización de este ensayo, se eligieron las cepas bacterianas aisladas de infecciones superficiales en el ser humano y de leche procedente de casos de mastitis bovina, seleccionando las cepas que resultaron, en general, más sensibles a las muestras JR NG, JR C y JR LP.

Cabe aclarar que, como se explicó en la sección de Materiales y Métodos, los EH de las muestras no fueron estudiados para evaluar su actividad antibacteriana por la técnica de difusión en pozo, debido a que se obtuvo poca cantidad de los mismos. Estos extractos sólo se utilizaron para realizar técnicas de separación por cromatografía en capa delgada.

Cuando se evalúan sustancias antimicrobianas no solubles en agua, es necesario incorporar un solvente para asegurar el contacto entre el microorganismo y la sustancia estudiada mientras dure el experimento. Uno de los más utilizados es el DMSO (Mann y Markham, 1998). Por esto, los EE fueron disueltos en DMSO; el mismo solvente es también utilizado como transportador de compuestos naturales, el cual favorece la difusión de los componentes con actividad antibacteriana en el medio de cultivo (Valgas y col., 2007). Los ED fueron disueltos en agua destilada estéril.

En la Tabla 20 se resumen los resultados de la actividad antibacteriana del EE y ED de JR NG, en la cual se observa el promedio de los diámetros de los halos de inhibición del crecimiento en milímetros. Las celdas sombreadas indican la mínima concentración del extracto requerida para ejercer efecto inhibitorio sobre cada cepa estudiada.

Tabla 20: Actividad antibacteriana del EE y ED de JR NG sobre cepas aisladas de infecciones superficiales en seres humanos y de mastitis en bovinos por la técnica de difusión en pozo

EE (mg/mL)							
Cepas Bacterianas	68	34	17	8,5	4,3	2.1	1
<i>E. faecalis</i> 3	14,7 (1,2)	10,0 (0,0)	6,3 (0,6)	NI	NI	NI	NI
<i>S. aureus</i> MS 2	9,7 (1,2)	7,0 (0,0)	NI	NI	NI	NI	NI
<i>S. aureus</i> MR 1	8,7 (1,2)	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>S. aureus</i> MR 2	12,0 (0,0)	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>S. agalactiae</i> 2	14,0 (0,0)	10,3 (0,6)	NI	NI	NI	NI	NI
<i>S. dysgalactiae</i> 3	11,7 (1,2)	6,7 (1,2)	5,0 (0,0)	NI	NI	NI	NI
<i>P. aeruginosa</i> 2	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
ED (mg/mL)							
Cepas Bacterianas	470	235	117,5	58,8	29,4	14,7	7,4
<i>E. faecalis</i> 3	14,3 (0,6)	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>S. aureus</i> MS 2	15,0 (0,0)	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>S. aureus</i> MR 1	13,0 (0,0)	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>S. aureus</i> MR 2	13,3 (0,6)	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>S. agalactiae</i> 2	11,7 (1,2)	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>S. dysgalactiae</i> 3	10,0 (0,0)	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>P. aeruginosa</i> 2	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI

Nota: NI: No Inhibe. Diámetros promedio de halos de inhibición del crecimiento y desvíos estándares (entre paréntesis) en milímetros.

A excepción de la cepa *P. aeruginosa* 2, todas las demás cepas ensayadas fueron sensibles al EE de la JR NG, siendo *E. faecalis* 3 y *S. dysgalactiae* 3 las cepas más sensibles debido a que resultaron inhibidas a menores concentraciones del extracto. Las cepas *S. aureus* MR 1 y MR 2 fueron las más resistentes, requiriéndose de la máxima concentración estudiada para ejercer un efecto inhibitorio del crecimiento.

Con respecto al ED, de igual modo que para el EE, *P. aeruginosa* 2 no resultó inhibida en su crecimiento en ninguna de las concentraciones evaluadas. El resto de las cepas fueron sensibles, aunque la inhibición del crecimiento bacteriano sólo se produjo a la máxima concentración del extracto (470 mg/mL); los diámetros de los halos de inhibición del crecimiento de las diferentes bacterias fueron similares.

A modo ilustrativo se presenta la Figura 21 correspondiente a la actividad antibacteriana del ED de la JR NG sobre la cepa *S. aureus* MR 2.



Figura 21: Actividad antibacteriana del ED de JR NG sobre *S. aureus* MR 2 por la técnica de difusión en pozo

Referencias: Concentración del ED de JR NG en mg/mL. 1: 470; 2: 235; 3: 117,5; 4: 58,8; 5: 29,4; 6: 14,7; 7: 7,4; D: diluyente del ED (agua destilada estéril); C (+): control positivo del crecimiento bacteriano

En la Tabla 21 se muestran los resultados de la actividad antibacteriana del EE y ED de la JR C, en la cual se detalla el promedio de los diámetros de los halos de inhibición del crecimiento en milímetros. Las celdas sombreadas indican la mínima concentración del extracto que fue requerida para ejercer efecto inhibitorio sobre cada una de las cepas estudiadas.

Tabla 21: Actividad antibacteriana del EE y ED de JR C sobre cepas aisladas de infecciones superficiales en seres humanos y de mastitis en bovinos por la técnica de difusión en pozo

EE (mg/mL)							
Cepas Bacterianas	66	33	16,5	8,3	4,2	2,1	1,1
<i>E. faecalis</i> 3	11,3 (0,6)	9,0 (0,0)	NI	NI	NI	NI	NI
<i>S. aureus</i> MS 2	9,7 (1,2)	6,0 (0,0)	NI	NI	NI	NI	NI
<i>S. aureus</i> MR 1	8,0 (0,0)	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>S. aureus</i> MR 2	10,0 (1,0)	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>S. aureus</i> A	14,0 (0,0)	12,3 (0,6)	11,3 (0,6)	7,7 (0,6)	NI	NI	NI
<i>S. agalactiae</i> 1*	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>S. agalactiae</i> 2	8,7 (1,2)	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>S. agalactiae</i> 3	14,7 (1,2)	12,3 (0,6)	10,0 (1,0)	7,7 (1,2)	NI	NI	NI
<i>S. agalactiae</i> A	9,7 (0,6)	9,0 (0,0)	NI	NI	NI	NI	NI
<i>S. agalactiae</i> B	12,3 (0,6)	9,7 (0,6)	7,7 (1,2)	NI	NI	NI	NI
<i>S. dysgalactiae</i> A	9,3 (0,6)	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>S. uberis</i> B	10,3 (0,6)	NI	NI	NI	NI	NI	NI
ED (mg/mL)							
Cepas Bacterianas	400	200	100	50	25	12,5	6,25
<i>E. faecalis</i> 3	10,7 (0,6)	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>S. aureus</i> MS 2	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>S. aureus</i> MR 1	9,0 (1,1)	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>S. aureus</i> MR 2	9,7 (1,2)	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>S. aureus</i> A	11,7 (0,6)	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>S. agalactiae</i> 2	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>S. agalactiae</i> B	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>S. dysgalactiae</i> A	9,7 (0,6)	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>S. uberis</i> B	8,7 (0,6)	NI	NI	NI	NI	NI	NI

Nota: NI: No Inhibe. Diámetros promedio de halos de inhibición del crecimiento y desvíos estándares (entre paréntesis) en milímetros.

Cabe destacar que, a excepción de la cepa *S. agalactiae* 1, el resto de las cepas ensayadas fueron todas sensibles al EE de la JR C. Los diámetros de los halos de inhibición del crecimiento de las diferentes bacterias fueron similares, a excepción de *S. aureus* A y de *S. agalactiae* 3, ambas cepas fueron las más sensibles al extracto ya que fueron inhibidas a menores concentraciones del mismo y se obtuvieron mayores halos de inhibición del crecimiento. Al igual que lo observado con el EE de la JR NG, las cepas *S. aureus* MR 1 y MR 2 fueron más resistentes, requiriéndose de la máxima concentración estudiada para ejercer efecto inhibitorio del crecimiento (Figura 22). En forma similar, las cepas *S. agalactiae* 2, *S. dysgalactiae* A y *S. uberis* también requirieron de la máxima concentración del extracto estudiado para lograr una inhibición completa de su desarrollo.

En cuanto al ED, a excepción de la cepa *S. aureus* MS 2 y de las cepas *S. agalactiae* 2 y B, que resultaron resistentes a todas las concentraciones probadas, el resto de las bacterias fueron sensibles a este extracto, aunque la inhibición del crecimiento sólo se produjo a la máxima concentración probada (400 mg/mL). Además, se observó que los diámetros de los halos de inhibición del crecimiento para las diferentes bacterias fueron similares.

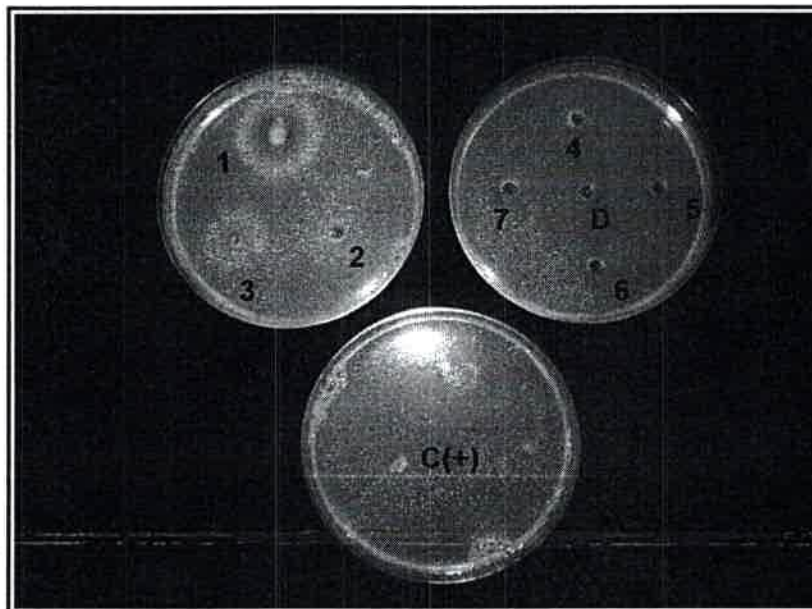


Figura 22: Actividad antibacteriana del EE de JR C sobre *S. aureus* MR 2 por la técnica de difusión en pozo

Referencias: Concentración del EE de JR C en mg/mL. 1: 66; 2: 33; 3: 16,5; 4: 8,3; 5: 4,2; 6: 2,1; 7: 1,1; D: diluyente del EE (DMSO); C (+): control positivo del crecimiento bacteriano

En la Tabla 22 se muestran los resultados de la actividad antibacteriana de los EE y ED de la JR LP. Se observa el promedio de los diámetros de los halos de inhibición del crecimiento en milímetros. Las celdas sombreadas indican la mínima concentración del extracto requerida para ejercer efecto inhibitorio sobre cada una de las cepas estudiadas.

Tabla 22: Actividad antibacteriana del EE y ED de JR LP sobre cepas aisladas de infecciones superficiales en seres humanos y de mastitis en bovinos por la técnica de difusión en pozo

EE (mg/mL)							
Cepas Bacterianas	80	40	20	10	5	2,5	1,3
<i>E. faecalis</i> 4	10,7 (0,6)	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>S. aureus</i> MS 2	8,7 (0,6)	6,3 (0,6)	NI	NI	NI	NI	NI
<i>S. aureus</i> MR 1	11,3 (0,6)	7,0 (0,0)	NI	NI	NI	NI	NI
<i>S. aureus</i> MR 2	10,7 (0,6)	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>S. agalactiae</i> 3	9,7 (0,6)	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>P. aeruginosa</i> 2	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI
ED (mg/mL)							
Cepas Bacterianas	550	225	112,5	56,3	28,2	14,1	7,1
<i>E. faecalis</i> 4	9,7 (0,6)	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>S. aureus</i> MS 2	9,0 (0,0)	6,3 (0,6)	NI	NI	NI	NI	NI
<i>S. aureus</i> MR 1	10,7 (0,6)	9,0 (1,0)	NI	NI	NI	NI	NI
<i>S. aureus</i> MR 2	12,3 (0,6)	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>S. agalactiae</i> 3	11,3 (0,6)	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<i>P. aeruginosa</i> 2	NI	NI	NI	NI	NI	NI	NI

Nota: NI: No Inhibe. Diámetros promedio de halos de inhibición del crecimiento y desvíos estándares (entre paréntesis) en milímetros.

A excepción de *P. aeruginosa* 2, todas las demás cepas ensayadas fueron sensibles al EE de la JR LP. Los diámetros de los halos de inhibición del crecimiento de las diferentes bacterias fueron similares. Las cepas *S. aureus* MS 2 y MR 1 resultaron ser las más sensibles al extracto, ya que ambas fueron inhibidas a menores concentraciones del mismo.

Con respecto al ED, la cepa *P. aeruginosa* 2 fue resistente a todas las concentraciones evaluadas. A diferencia de lo observado para los ED de las muestras JR NG y JR C, el ED de la JR LP resultó ser el más activo debido a que ejerció un efecto inhibitorio sobre las cepas *S. aureus* MS 2 y MR 1 y con menores concentraciones. Ambas cepas bacterianas fueron las más sensibles a ambos extractos de JR LP.

En la bibliografía consultada, se puede ver que las muestras de jalea real completas resultaron ser menos activas que sus fracciones solubles en éter, al ser evaluadas a concentraciones similares y por la técnica de difusión en pozo sobre *Sytophylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Streptomyces sp.* Estos investigadores además observaron que las fracciones desgrasadas no mostraron actividad antibacteriana sobre dichas bacterias en comparación a la fracción lipídica soluble en éter, cuando ambas muestras fueron evaluadas a concentraciones de 30 mg/mL. La fracción desgrasada (o no soluble en éter) mostró halos de inhibición del crecimiento bacteriano a concentraciones de 300 mg/mL (Eshraghi, 2005). En el presente trabajo se observaron resultados coincidentes ya que, aunque los halos de inhibición del crecimiento obtenidos a partir de las “soluciones madres” del EE y del ED fueron similares, los EE se evaluaron a concentraciones de aproximadamente unas siete veces menores con respecto a los ED, lo que indicaría una fuerte actividad en la fracción lipídica de las muestras de jalea real liofilizadas que fueron utilizadas en este trabajo de investigación. Otros estudios, realizados sobre *B. subtilis* y *S. aureus*, demostraron que la fracción de jalea real soluble en éter resultó ser más activa que la jalea real completa y que la fracción insoluble en éter. El principal componente de la fracción soluble en éter es el 10-HDA el cual corresponde a un 38 % del total de los ácidos grasos (Yatsunami y Echigo, 1985).

Para el caso de las muestras utilizadas en el presente trabajo de Tesis, se puede observar que en algunos casos, la jalea real completa resultó activa sobre determinadas cepas bacterianas aunque no fueron activos sus correspondientes extractos. Esto posiblemente se debe a que las concentraciones de los componentes activos en las muestras completas podrían encontrarse en mayor concentración con respecto a los extractos, ya que al realizar la técnica de difusión en pozo, las muestras puras fueron evaluadas utilizando porcentaje p/p de las mismas, del 10 al 100%.

Por lo anteriormente expresado y, de acuerdo con los resultados obtenidos en el estudio de la actividad antibacteriana de los EE y ED, se observó que los primeros ejercieron una mayor actividad sobre las cepas evaluadas en comparación con los segundos; por ello se procedió a continuar con la profundización del estudio de la fracción lipídica de la jalea real. Con ese fin, se utilizaron tanto la muestra de referencia (JR NG) como la muestra que resultó, en general, ser la más activa con respecto a las otras (JR C).

7. Ensayo de la actividad antibacteriana de extractos lipídicos de jalea real por la técnica de bioautografía indirecta

7.1. Separación de compuestos de los extractos etéreo (EE) y hexánico (EH) de jalea real por cromatografía en capa delgada

Debido a que los extractos lipídicos resultaron ser más activos que sus correspondientes extractos desgrasados, se realizó la caracterización e identificación de los compuestos con actividad antibacteriana en las muestras JR NG y JR C empleando la técnica de bioautografía indirecta. Para ello, en principio se realizó la separación de los componentes de los EE y EH de dichas muestras por CCD.

En primera instancia, se sembraron cromatofolios de 5 cm de alto x 3 cm de ancho con 0,75 mg de EE y 0,5 mg de EH, ambos correspondientes a JR C. Los ensayos se realizaron por cuadruplicado y las cantidades sembradas correspondieron a valores aproximados.

A fin de desarrollar los cromatogramas se comenzó aplicando a ambos extractos una FM compuesta por dos solventes de diferente polaridad: hexano (H) y éter dietílico (Et), los cuales se utilizaron en las siguientes proporciones:

- a) H:Et 90:10 (v/v)
- b) H:Et 70:30 (v/v)
- c) H:Et 50:50 (v/v)
- d) H:Et 20:80 (v/v)

En el caso de los EE, se pudo observar que los sistemas de solventes (FM) H:Et 20:80 (v/v) y 50:50 (v/v) mostraron la mejor resolución. Se observaron tres bandas,

quedando otra sobre la línea de siembra mientras que un frente tenue avanzó con el solvente.

Posteriormente, se sembraron cromatofolios de 14 cm de alto x 5 cm de ancho con 1,5 mg de EE correspondiente a JR C. Se utilizaron cromatofolios de mayor longitud para permitir un mayor recorrido de la FM, intentando mejorar la separación de los componentes que eluyeron con el frente del solvente. Los ensayos se realizaron por cuadruplicado y las cantidades sembradas correspondieron a valores aproximados.

Para intentar mejorar aún más la resolución de los compuestos de los EE de ambas muestras en estudio, se utilizaron proporciones de solventes levemente diferentes:

a) H:Et 30:70 (v/v)

b) H:Et 35:65 (v/v)

Se observó que la FM compuesta por H:Et 35:65 (v/v) resultó la más adecuada para ser aplicada al EE de muestras de jalea real. Con esta composición de FM, la banda que permanecía en la zona de siembra, se movió desde ella al cambiar la proporción de los solventes. De esta manera, se consiguió separar cuatro bandas en ambos EE (Figuras 23 y 24).

En el caso del EH, los sistemas de solventes H:Et 90:10 (v/v) y 70:30 (v/v) permitieron una adecuada separación de las bandas. Se observaron tres bandas, mientras que otra eluyó junto al frente del solvente y una más cerca de la línea de siembra.

Posteriormente, se sembraron cromatofolios de 14 cm de alto x 5 cm de ancho con 1 mg de EH correspondiente a JR C. Se utilizaron cromatofolios de mayor longitud para permitir un mayor recorrido de la FM, intentando mejorar la separación de los componentes que eluyeron con el frente del solvente. Los ensayos se realizaron por cuadruplicado y las cantidades sembradas corresponden a valores aproximados.

Para desarrollar los cromatofolios se utilizaron las FM que mostraron mejor resolución de las bandas:

a) H:Et 90:10 (v/v)

b) H:Et 70:30 (v/v)

Se observó que la FM compuesta por H:Et 90:10 (v/v) resultó la más adecuada para ser aplicada al EH de muestras de jalea real. También en este caso se logró la separación de cuatro bandas (Figura 25).

Para ambos extractos, a pesar de aumentar la distancia del recorrido en los cromatogramas, continuaron eluyendo componentes con el frente del solvente.

Una vez puesta a punto la técnica de separación de compuestos de los EE y EH de jalea real por CCD, se obtuvieron los cromatogramas de los extractos de las muestras JR C y JR NG a fin de ser luego utilizados en el estudio de actividad antibacteriana por bioautografía indirecta. Para ello, se realizó la siembra en cromatofolios de 7 cm de alto x 3 cm de ancho de los EE y EH de las muestras JR C y JR NG (1 mg de extracto/cromatofolio). Los mismos se desarrollaron utilizando la FM H:Et 35:65 (v/v) (para los EE) y H:Et 90:10 (v/v) (para los EH). Los ensayos se realizaron por triplicado.

Los cromatogramas obtenidos con ambas muestras (JR NG y JR C) mostraron el mismo patrón de bandas en el EE (comparar Figuras 22 y 23). Esto indica que los componentes de dicho extracto no variarían, en principio, con el origen geográfico de la muestra de jalea real. Es conveniente resaltar aquí que, como se observó anteriormente tras el análisis estadístico del punto 5.3.1., las muestras JR C y JR NG (que poseen el mismo patrón de bandas en sus EE), fueron las que tuvieron en promedio menor CIM sobre las bacterias estudiadas, cuando se realizó la técnica de difusión en pozo.

Con respecto al EH, en ninguno de los cromatofolios sembrados con el EH de JR NG se observaron bandas, sino una mancha completa en la zona de recorrido de la FM. Por lo tanto, sólo se procedió a continuar el estudio con ambos EE y con el EH de la muestra de JR C.

Para mejorar la visualización de las bandas se sembraron cromatofolios de 7 cm de alto x 3 cm de ancho con mayor cantidad de los EE de ambas muestras y del EH de la JR C (2,3 mg del extracto/cromatofolio, aproximadamente). Los ensayos se realizaron por triplicado. La Figura 23 muestra el cromatograma obtenido tras la siembra del EE de la JR NG y la Figura 24 el obtenido a partir del EE de la JR C. Como se indicó anteriormente, en ambos extractos etéreos se observan las mismas bandas, con R_f similares para cada una de las ellas. En la Figura 25 se pueden observar las bandas correspondientes al EH de la JR C.

Se destaca que, aumentando al doble la concentración de los diferentes extractos sembrados, y manteniendo los mismos sistemas de solventes, se mejora la visualización de las bandas de los compuestos eluidos sin cambiar notoriamente los R_f de los mismos. Los diferentes cromatogramas desarrollados en este punto fueron utilizados en los ensayos de actividad antibacteriana por la técnica de bioautografía indirecta y se realizaron comparaciones con aquellos sembrados con la mitad de la cantidad de los extractos en estudio.

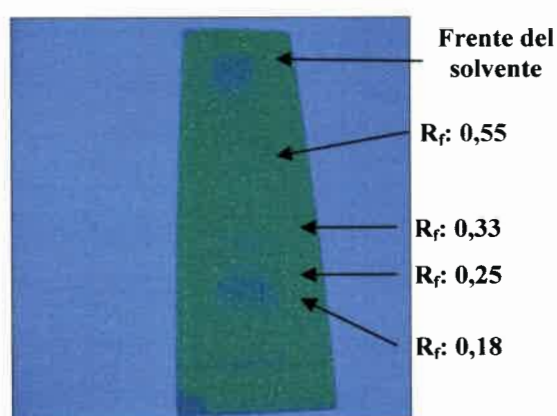


Figura 23: CCD del EE de JR NG
FM: H:Et 35:65 (v/v)

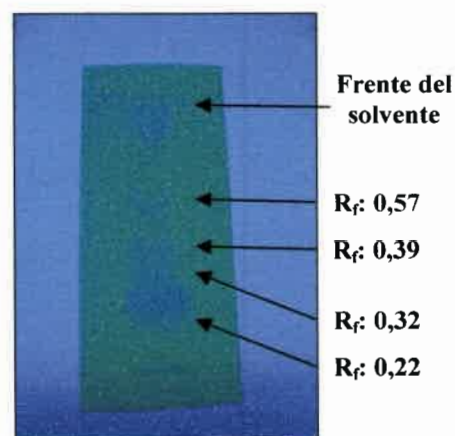


Figura 24: CCD del EE de JR C
FM: H:Et 35:65 (v/v)

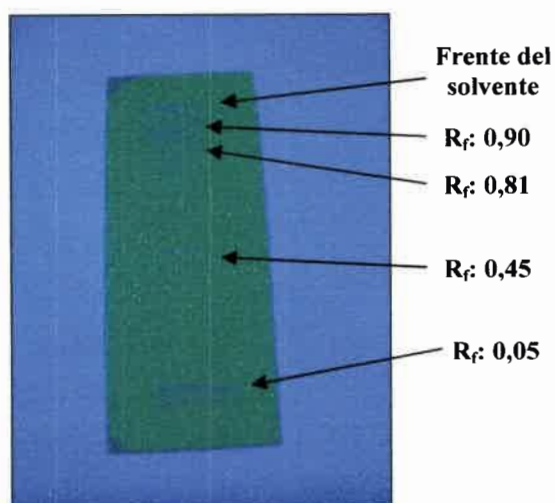


Figura 25: CCD del EH de JR C
FM: H:Et 90:10 (v/v)

En la bibliografía consultada se informa que al utilizar el mismo tipo de sílica gel y un sistema de solventes similar, para desarrollar las CCD del extracto lipídico de jalea real, se obtienen resultados análogos a los del presente trabajo. Estos investigadores caracterizaron por cromatografía gaseosa los compuestos eluidos. También se encontró que eluía una banda con un R_f de 0,05 correspondientes a ácidos grasos dihidroxilados. Aquellos compuestos que eluían en un intervalo de R_f entre 0,18 y 0,27 correspondían a ácidos grasos monohidroxilados. Por otra parte, aquellas bandas con un R_f de 0,38 correspondieron a esteroides. Además, se obtuvieron bandas en un intervalo de R_f entre 0,60 y 0,74, los cuales correspondieron a ácidos dicarboxílicos. Por último, los compuestos más afines al sistema de solventes con R_f entre 0,90 y 0,97 correspondieron a ácidos grasos y a hidrocarburos (Lercker y col., 1981).

7.2. *Técnica de bioautografía indirecta*

Una vez puesta a punto la separación de los compuestos de ambos extractos lipídicos de jalea real (EE y EH), se procedió a evaluar la actividad antibacteriana de los mismos. Para ello se realizó la técnica de bioautografía utilizando la metodología descrita por Gende y col (2008) con una modificación. La misma consistió en utilizar TTC al 0,05 % en lugar del 5 %.

La bioautografía es una técnica utilizada para detectar sustancias que afectan la velocidad de crecimiento de los microorganismos a partir de una mezcla compleja. Es un método de “screening” que da idea de la presencia o ausencia de sustancias con actividad antimicrobiana en productos naturales. Por lo tanto, es considerada una técnica cualitativa. Uno de los campos de aplicación de la bioautografía es la investigación de antibióticos y de otros compuestos biológicamente activos en agua, fluidos corporales, alimentos, etc. (Ratanavalachai y Wongchai, 2002).

En primer lugar, se realizó la metodología utilizando los cromatogramas sembrados con los EE de ambas muestras y con el EH de la JR C. En todos los casos, se sembró aproximadamente 1 mg del extracto/cromatofolio. Los ensayos se realizaron por triplicado, observándose los mismos resultados en cada uno de ellos y para cada extracto. Para el caso del EE de la JR C, se pudo observar, de manera muy tenue, una zona de inhibición en las bandas cuyos R_f se encuentran en el intervalo de 0,22 a 0,39.

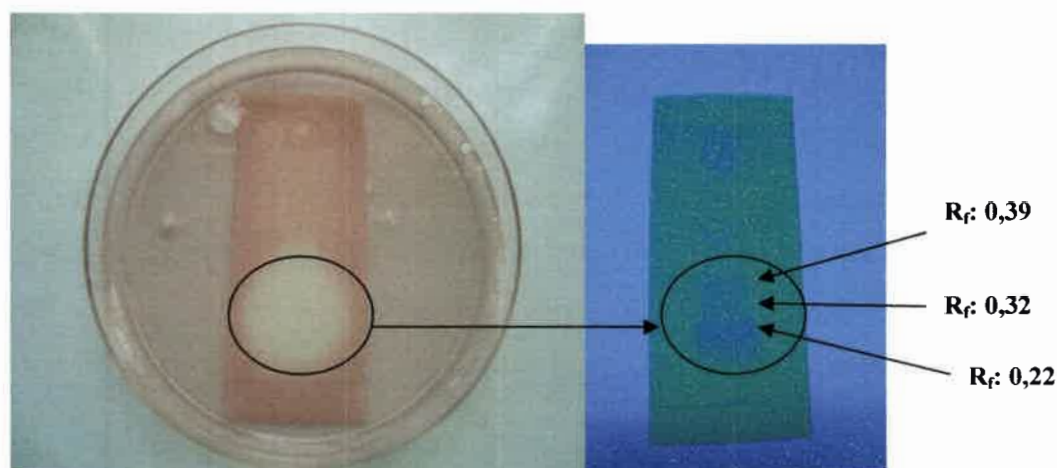


Figura 26: Bioautografía del EE de JR C (2,3 /cromatofolio) sobre *S. aureus* MS 1. Cromatograma desarrollado en placa de sílica gel de 7 cm de alto x 3 cm de ancho. FM: H:Et 35:65 (v/v)

La Figura 27 muestra la bioautografía realizada a partir del EE de la JR NG sobre la cepa en estudio. En ella, también se observa una gran zona de inhibición del desarrollo bacteriano que abarca tres bandas del cromatograma tal como se indica con la flecha sobre el cromatograma a la derecha de la figura. Las bandas que poseen actividad antibacteriana sobre *S. aureus* MS 1 corresponden a los R_f 0,18; 0,25 y 0,33 obteniéndose resultados similares a los anteriores cuando se sembró menor cantidad de extracto.

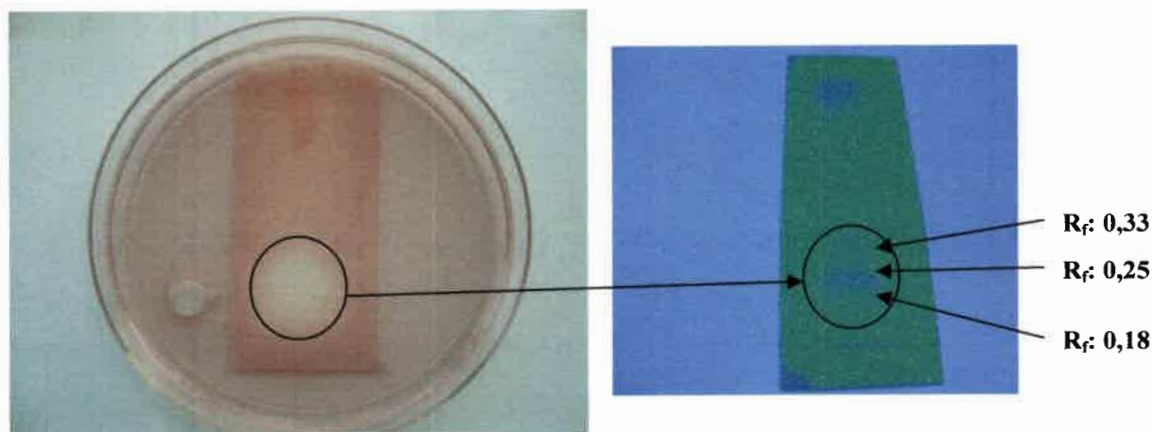


Figura 27: Bioautografía del EE de JR NG (2,3 /cromatofolio) sobre *S. aureus* MS 1. Cromatograma desarrollado en placa de sílica gel de 7 cm de alto x 3 cm de ancho. FM: H:Et 35:65 (v/v)

Por lo tanto, los compuestos del EE de la JR C que fueron más retenidos por la sílica gel, y por ende, de mayor polaridad, demostraron ejercer actividad antibacteriana sobre *S. aureus* MS 1. Con respecto al EE de la JR NG se pudieron observar resultados similares, debido a que las zonas de inhibición se correspondieron con las bandas cuyos R_f se encuentran en el intervalo de 0,18 a 0,33. Al igual que lo observado para el EE de JR C, los compuestos del EE de la JR NG más retenidos por la sílica gel (de mayor polaridad) demostraron ejercer actividad antibacteriana sobre la cepa *S. aureus* MS 1. En cuanto al ensayo realizado a partir del EH de la JR C, se observó una zona tenue de inhibición del crecimiento bacteriano que se corresponde con la última banda eluída en el cromatograma (R_f : 0,05); por lo tanto, el compuesto de mayor polaridad del EH de la JR C demostró actividad antibacteriana sobre la cepa *S. aureus* MS 1.

A continuación, se procedió a realizar la bioautografía a partir de los cromatogramas sembrados con mayor cantidad de ambos EE y del EH de la JR C para mejorar la visualización de las bandas. En cada caso, se sembraron aproximadamente 2,3 mg del extracto/cromatofolio. Además, se utilizó mayor volumen del inóculo bacteriano (1.000 μ L en lugar de 200 μ L como se utilizó anteriormente), manteniendo la misma concentración de TTC (0,05 % p/v), para mejorar la visualización de las zonas de inhibición del crecimiento bacteriano.

En la Figura 26 se observan los resultados de la bioautografía realizada a partir del cromatograma desarrollado con el EE de la JR C en la cual, a la izquierda, se observa la placa de Petri tras su incubación a 37 °C por 24 h, donde el color rosado indica crecimiento bacteriano; a la derecha, se observa el cromatograma a partir del cual se realizó dicha bioautografía, mostrando el patrón de bandas bajo la luz UV.

Se observa una gran zona de inhibición del desarrollo bacteriano que se demuestra por la ausencia de coloración y, tal como lo indica la flecha sobre el cromatograma a la derecha de la figura, abarca las tres bandas correspondientes a los R_f 0,22; 0,32 y 0,39, obteniéndose resultados similares a los anteriores cuando se sembró menor cantidad de extracto.

Los ácidos grasos de la jalea real han atraído la atención de los investigadores debido a sus interesantes rasgos químicos y a sus actividades farmacológicas (Tani y col., 2009). Como se explicó anteriormente, otros trabajos informan que los compuestos eluidos en el intervalo de R_f entre 0,18 y 0,27 corresponden a ácidos grasos monohidroxilados (Lercker y col., 1981). El principal ácido graso en la jalea real es un ácido graso monohidroxilado, el 10-HDA (García-Amoedo y Almeida-Muradian, 2003). La cantidad de este ácido graso en jalea real pura varía dependiendo del origen de la misma y de las características de las abejas. Se ha comprobado que el 10-HDA posee una gran variedad de efectos farmacológicos, tales como actividad antitumoral, promotor de la producción de colágeno y actividad antibiótica (Yang y col., 2010). Con respecto a su espectro antimicrobiano, se ha informado que el 10-HDA inhibe el crecimiento de hongos y de bacterias Gram positivo y Gram negativo tales como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* (Hornitzky, 1998; Isidorov y col., 2011; Melliou y Chinou, 2005).

En la Figura 28 se muestra la bioautografía realizada con el cromatograma desarrollado a partir del EH de la JR C, en la cual se observa una zona de inhibición bien definida que se corresponde con la última banda eluida en el cromatograma (R_f : 0,05) tal como se indica con la flecha; por lo tanto, el compuesto de mayor polaridad del EH de la JR C demostró tener actividad antibacteriana sobre la cepa *S. aureus* MS 1, observándose resultados similares a los anteriormente descritos.

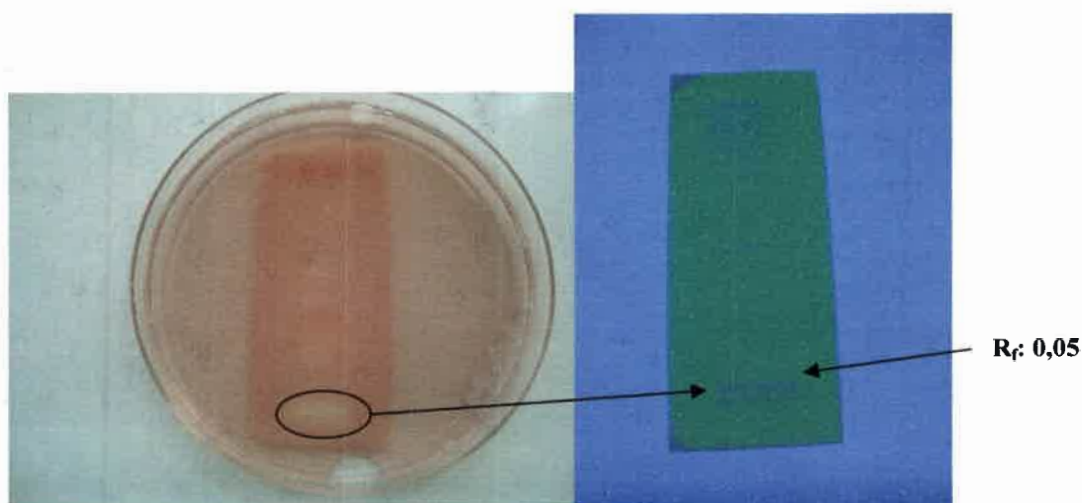


Figura 28: Bioautografía del EH de JR C (2,3 mg/cromatofolio) sobre *S. aureus* MS 1. Cromatograma desarrollado en placa de sílica gel de 7 cm de alto x 3 cm de ancho. FM: H:Et 90:10 (v/v)

Luego de realizados los diferentes ensayos de bioautografía se pudo demostrar que, al aumentar la cantidad de extracto, se observa una mayor actividad inhibitoria sobre la cepa *S. aureus* MS 1. Por otra parte, se pudo mejorar la visualización de la zona de inhibición al incrementar la cantidad de inóculo bacteriano utilizado, lo que conllevó a un aumento en la intensidad del color rosado del formazán debido a un incremento de la actividad respiratoria de las bacterias.

En los EE de ambas muestras no se demarcaron correctamente las bandas con actividad antibacteriana. Para evitar este inconveniente se realizó la siembra de menor cantidad de cada extracto (0,75 mg/cromatofolio), pero manteniendo la misma cantidad de inóculo bacteriano (1 mL).

En la Figura 29 se observan los resultados de la bioautografía realizada a partir del cromatograma desarrollado con el EE de JR C en la cual, a la izquierda, se observa la placa de Petri tras su incubación a 37 °C por 24 h, donde el color rosado indica crecimiento bacteriano; a la derecha se observa el cromatograma a partir del cual se realizó dicha bioautografía, mostrando el patrón de bandas bajo la luz UV. Se observa una pequeña zona de inhibición del desarrollo bacteriano, que se demuestra por ausencia de coloración y, como indica la flecha sobre el cromatograma a la derecha de la figura, abarca la banda correspondiente al R_f 0,22.

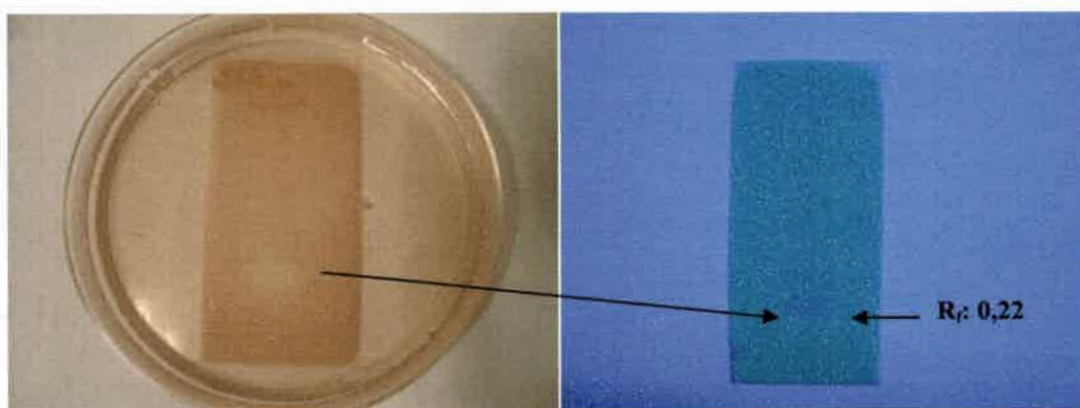


Figura 29: Bioautografía del EE de JR C (0,75 mg/cromatofolio) sobre *S. aureus* MS 1. Cromatograma desarrollado en placa de sílica gel de 7 cm de alto x 3 cm de ancho. FM: H:Et 35:65 (v/v)

En la Figura 30 se observan los resultados de la bioautografía realizada a partir del cromatograma desarrollado con el EE de la JR NG (0,75 mg/cromatofolio). Se observa una pequeña zona de inhibición del desarrollo bacteriano que se demuestra por ausencia de coloración y, como indica la flecha sobre el cromatograma de la derecha de la figura, abarca la banda correspondiente al R_f 0,18.

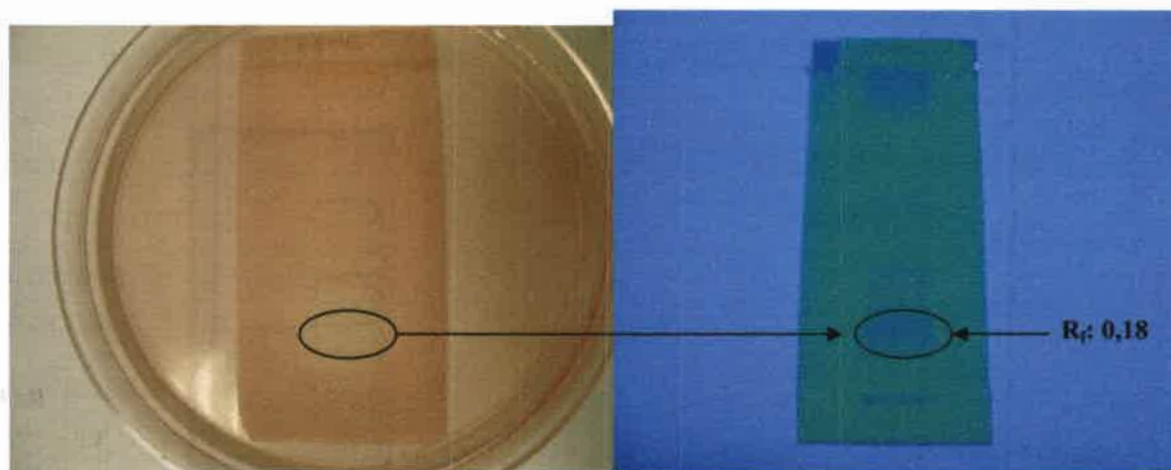


Figura 30: Bioautografía del EE de JR NG (0,75 mg/cromatofolio) sobre *S. aureus* MS 1. Cromatograma desarrollado en placa de sílica gel de 7 cm de alto x 3 cm de ancho. FM: H:Et 35:65 (v/v)

Otros investigadores utilizaron diferentes sistemas de solventes para desarrollar cromatogramas del extracto lipídico de jalea real y luego, a través de la bioautografía, verificaron que las sustancias antibacterianas de dicho extracto se encuentran en la fracción ácida y podrían ser compuestos polares aromáticos o compuestos insaturados dado que el promedio de R_f es 0,07, cuando se utiliza el sistema de solventes 29 % metanol en cloroformo a temperatura ambiente, mientras que el valor promedio de R_f es 0,66, cuando se utiliza el sistema hexano:éter dietílico en proporción 1,5:1 a 0 °C (Eshraghi, 2005).

Una vez puesta a punto la técnica de bioautografía en cuanto a cantidades de extracto sembradas en cada cromatofolio y cantidad de inóculo bacteriano utilizado, se realizaron ensayos, a modo comparativo para el EE de JR C, utilizando las cepas que resultaron las más sensibles dentro de cada grupo de bacterias aisladas de mastitis bovina, cuando se analizaron por la técnica de difusión en pozo con JR C completa. Las cepas utilizadas fueron *Staphylococcus aureus* A, *Streptococcus agalactiae* B y *Escherichia coli* B.

En la Figura 31 se muestran los resultados de la bioautografía realizada a partir del cromatograma desarrollado con el EE de JR C (0,75 mg/cromatofolio) sobre *S. aureus* A. Se utilizó 1 mL del inóculo bacteriano correspondiente. Se observa una zona de inhibición del desarrollo bacteriano que se demuestra por ausencia de coloración rojiza del formazán y, como indica la flecha sobre el cromatograma a la derecha de la figura, abarca la banda correspondiente al R_f 0,22.

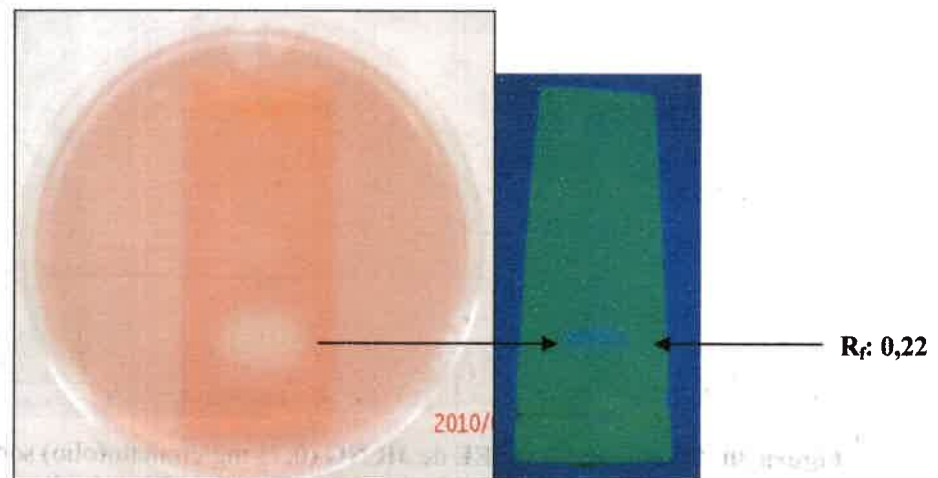


Figura 31: Bioautografía del EE de JR C (0,75 mg/cromatofolio) sobre *S. aureus* A. Cromatograma desarrollado en placa de sílica gel de 7 cm de alto x 3 cm de ancho. FM: H:Et 35:65 (v/v)

De igual modo, la Figura 32 muestra los resultados de la bioautografía realizada a partir del cromatograma desarrollado con el EE de JR C (0,75 mg/cromatofolio) sobre *E. coli* B. También se utilizó 1 mL del inóculo bacteriano correspondiente. En esta fotografía, se observa una menor zona de inhibición del crecimiento bacteriano con respecto a la mostrada en la Figura 30, la misma también correspondió a la banda con R_f : 0,22. Estos resultados coinciden con lo observado en la técnica de difusión en pozo, en la cual las bacterias Gram negativo fueron las más resistentes a la acción antibacteriana de la JR C completa con respecto a las Gram positivo, observándose halos de inhibición del crecimiento de menor tamaño en el caso de las primeras.

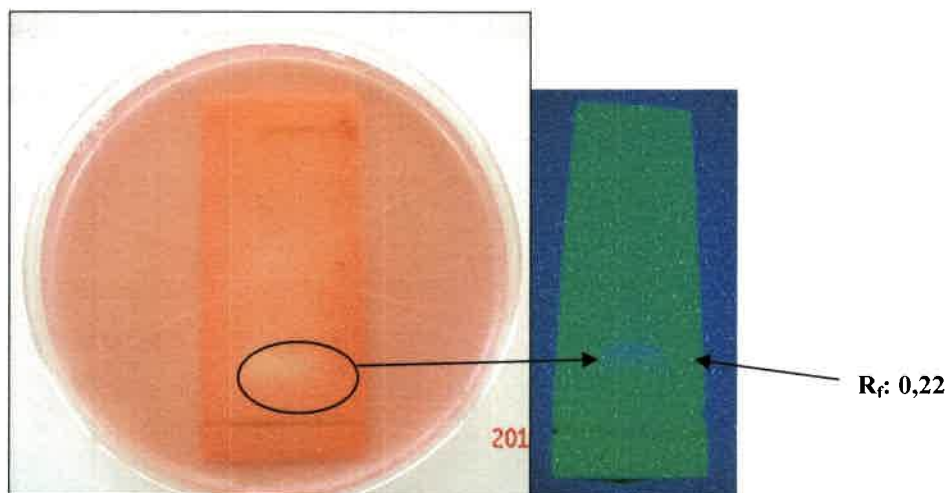


Figura 32: Bioautografía del EE de JR C (0,75 mg/cromatofolio) sobre a *E. coli* B. Cromatograma desarrollado en placa de sílica gel de 7 cm de alto x 3 cm de ancho. FM: H:Et 35:65 (v/v)

Con respecto a la bioautografía ensayada sobre la cepa *S. agalactiae* B, se pudo observar una zona de inhibición del crecimiento bacteriano que también correspondió a la banda con R_f 0,22. La visualización de las zonas de inhibición del crecimiento bacteriano no fue la óptima debido a que el cambio de color fue tenue, por lo que no se pudieron obtener buenas fotografías demostrativas.

Se pudo concluir que la fracción lipídica activa del EE de JR C corresponde a una banda con un R_f de 0,22 por lo que se continuó con la obtención y el estudio de los componentes activos de dicha banda sobre un mayor número de bacterias.

De esta manera, se pudo observar que la técnica de bioautografía es de gran utilidad para evaluar la actividad antibacteriana de extractos de diferentes productos naturales. Esta técnica, también fue utilizada por Sawaya y col. (2004), quienes realizaron bioautografía de extractos etanólicos de propóleos y observaron una gran zona que inhibió el crecimiento de *S. aureus*. Por otro lado, Gende y col. (2008), observaron por bioautografía que el aceite esencial de canela y dos de sus principales componentes (cinamaldehído y eugenol) presentaron actividad antibacteriana sobre cepas de *P. larvae*, agente causal de la Loque Americana de las abejas, utilizando cepas obtenidas de diferentes orígenes geográficos.

8. Ensayos de actividad antibacteriana de la fracción lipídica activa (FLA) del extracto etéreo (EE) de JR C por la técnica de microdilución en caldo

8.1. Separación y obtención de los compuestos del extracto etéreo (EE) de JR C

A fin de obtener una mayor cantidad de la fracción lipídica activa del EE de la jalea real, para poder realizar los diferentes experimentos de actividad antibacteriana, se procedió a efectuar una cromatografía en columna de sílica gel, como se detalló en el punto 9.1 de la sección Materiales y Métodos.

A partir de la columna sembrada con el EE de la JR C se obtuvieron 113 fracciones de 2 mL cada una. Luego de realizar CCD de estas fracciones (y del EE completo de la JR C a fin de realizar comparaciones) se observó bajo luz UV y se comprobó que las 113 fracciones se correspondían a 5 fracciones únicamente debido a que se observaron 5 bandas con diferentes R_f . Las bandas correspondieron a los siguientes R_f 0,22; 0,32; 0,39, 0,57 y 1,00. Estos resultados concuerdan con lo observado en el punto 7.1 de esta sección. Por lo tanto, se procedió a coleccionar todas las fracciones de una misma banda (igual R_f) en un único recipiente. Se conservó la fracción correspondiente a la banda de R_f 0,22 debido a que ejerció actividad antibacteriana (evaluada por bioautografía) sobre las cepas *S. aureus* MS 1, *S. aureus* A, *E. coli* B y *S. agalactiae* B. La banda activa se denominó fracción lipídica activa (FLA) del EE de la JR C.

En la Figura 33 se muestra el cromatograma obtenido tras la siembra de la FLA del EE de la JR C y del 10-HDA patrón. Se puede observar en ella que la FLA contiene una sola banda que coincide con el R_f del patrón (R_f 0,22).

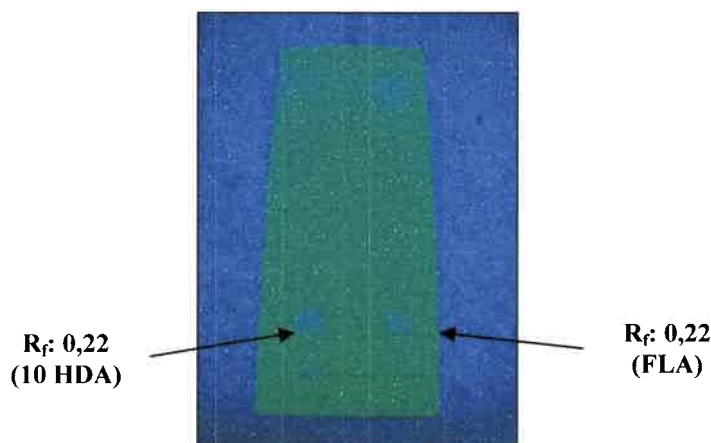


Figura 33: Cromatograma de la FLA del EE de JR C y del 10-HDA

Con la finalidad de evaluar la actividad antibacteriana de la FLA del EE de JR C y obtener resultados cuantitativos, se procedió a realizar la determinación de CIM mediante la técnica de microdilución en caldo, la cual fue previamente puesta a punto para muestras de jalea real completa, siendo posible, por lo tanto, ser utilizada para sus correspondientes extractos. A modo comparativo se obtuvo la CIM del 10-HDA patrón para cada cepa evaluada con la FLA del EE de JR C.

8.2. Determinación de la concentración inhibitoria mínima de la fracción lipídica activa (FLA) del EE de JR C y del ácido 10-hidroxi-2-decenoico (10-HDA) patrón por la técnica de microdilución en caldo

Para realizar el estudio de la actividad antibacteriana de la FLA del EE de JR C y del 10-HDA patrón por la técnica de microdilución en caldo, se prepararon “soluciones madre” de cada uno de ellos, utilizando como solvente una mezcla estéril de DMSO/agar-agar al 0,15 %, en proporción 50:50. Se preparó una “solución madre” de aproximadamente 24 mg de FLA/mL y una “solución madre” de aproximadamente 28 mg del 10-HDA/mL. Luego de la incubación se obtuvieron las correspondientes CIM para cada una de las cepas bacterianas ensayadas, registradas por el último pocillo en donde no se observó coloración rosada, o sea donde no hubo desarrollo bacteriano. Es importante destacar que en todos los casos se obtuvieron los mismos resultados (igual valor de CIM) en los tres ensayos realizados para cada bacteria. Además, no se

observó cambio de coloración en ninguno de los pocillos correspondientes a los controles negativos (diluciones de FLA o del 10-HDA, sin la incorporación del inóculo bacteriano) indicando que las diferentes concentraciones evaluadas de ambos no fueron capaces de reducir al TTC por sí solas.

En la Tabla 23 se muestran los resultados obtenidos indicando la CIM de la FLA y del 10-HDA sobre las cepas bacterianas que fueron ensayadas por la técnica de microdilución en caldo.

Tabla 23: Actividad antibacteriana de la FLA del EE de JR C y del 10-HDA por técnica de microdilución en caldo (CIM: mg/mL, n=3)

Cepas Bacterianas	CIM FLA	CIM 10-HDA
<i>E. faecalis</i> 1*	2,4	2,8
<i>E. faecalis</i> 2	1,2	1,4
<i>E. faecalis</i> 3	1,2	1,4
<i>E. faecalis</i> 4	2,4	2,8
<i>E. faecium</i>	2,4	2,8
<i>S. aureus</i> MS 1*	1,2	1,4
<i>S. aureus</i> MS 2	1,2	1,4
<i>S. aureus</i> MR 1	1,2	1,4
<i>S. aureus</i> MR 2	2,4	2,8
<i>S. aureus</i> A	2,4	2,8
<i>S. agalactiae</i> 1*	NI	NI
<i>S. agalactiae</i> 2	2,4	2,8
<i>S. agalactiae</i> 3	0,6	0,7
<i>S. agalactiae</i> B	2,4	2,8
<i>S. uberis</i> A	1,2	1,4
<i>Enterobacter</i> sp.	NI	NI
<i>E. coli</i> B	NI	NI
<i>K. pneumoniae</i>	NI	NI
<i>P. aeruginosa</i> 2	NI	NI

Nota: *: cepa de referencia; NI: No Inhibe

En la Tabla 23 se observa que la cepa más sensible tanto a la FLA como al 10-HDA fue *S. agalactiae* 3, observándose una CIM menor con respecto al resto de las cepas estudiadas. Por el contrario, las cepas *S. agalactiae* 1, *P. aeruginosa* 2, *Enterobacter sp.*, *E. coli* B y *K. pneumoniae* fueron las más resistentes a la FLA y al 10-HDA, debido a que no se observó inhibición del crecimiento en ninguna de las concentraciones ensayadas. Sobre la mayoría de las cepas se obtuvo una CIM de 1,2 y 2, 4 mg/mL para la FLA y de 1,4 y 2,8 mg/mL para el 10-HDA. Además, puede observarse que las CIM, tanto de FLA como de 10-HDA, son similares pudiendo sugerirse que la FLA estaría compuesta, prácticamente, por el ácido graso exclusivo de la jalea real, el 10-HDA, como también se indica en la cromatografía en capa delgada del punto 8.1. de esta sección, en donde se observa una única banda para la FLA con un R_f similar al de su correspondiente patrón (Figura 33).

A modo de ejemplo en la Figura 34 se muestran los resultados de la actividad antibacteriana de la FLA del EE de la JR C obtenidos por técnica de microdilución en caldo con la cepa *S. aureus* MS 1. La CIM corresponde al pocillo 2 (1,2 mg/mL), última dilución de FLA en la que se observa ausencia de coloración rosada.

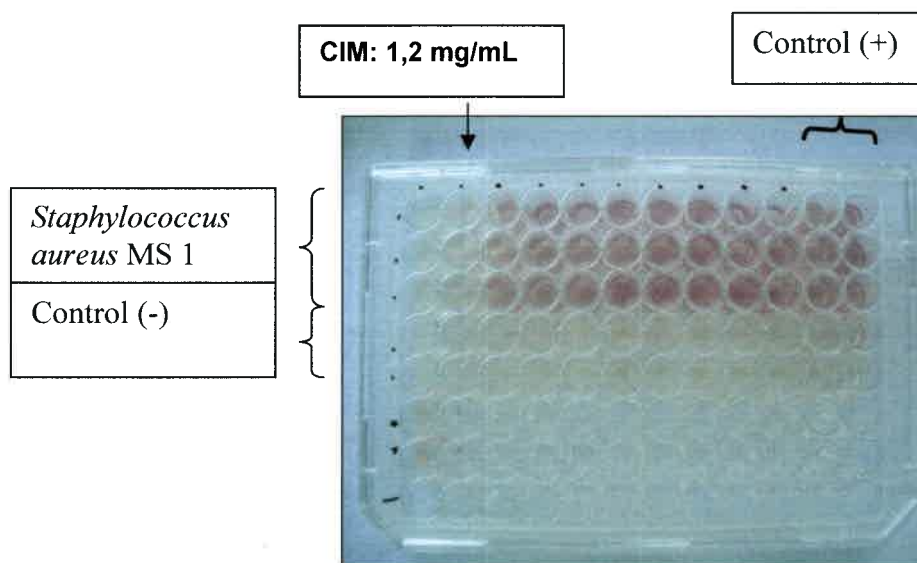


Figura 34: Actividad antibacteriana de FLA del EE de JR C sobre *S. aureus* MS 1 por la técnica de microdilución en caldo

9. Estudio de la composición química de la fracción lipídica activa del EE de JR C

9.1. Cromatografía gaseosa con detector de ionización de llamas (GC-FID)

En la Figura 35 se muestra el cromatograma obtenido tras la inyección de la FLA del EE de la JR C derivatizada de JR C en el GC-FID. El pico correspondiente a los 12,38 min pertenece a la FLA, tal como lo indica la flecha.

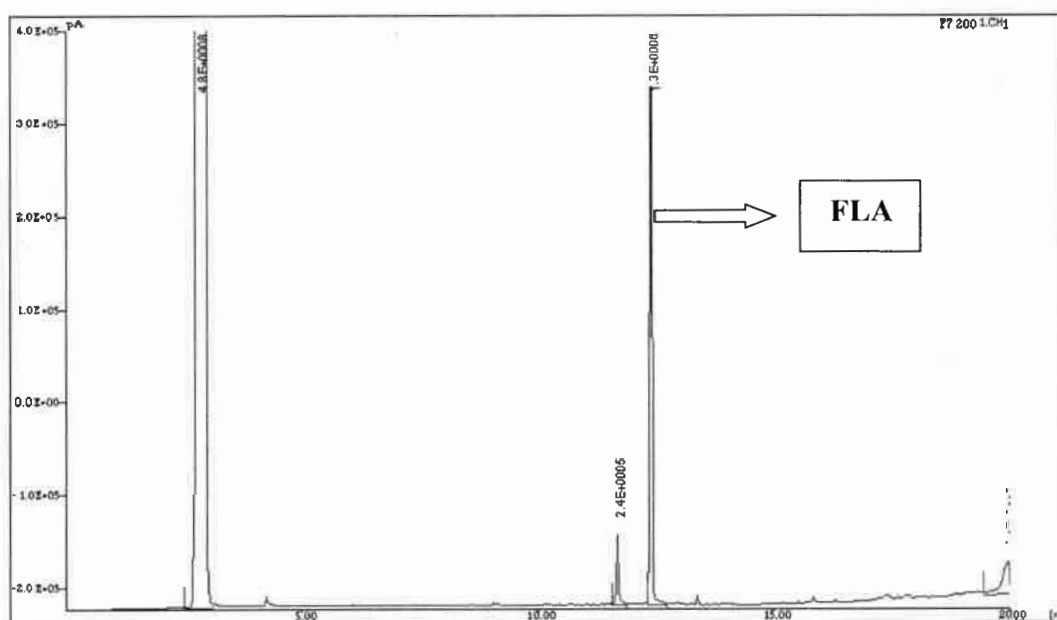


Figura 35: Cromatograma obtenido tras la inyección de la FLA del EE de JR C en GC-FID

En la Figura 36 se muestra el cromatograma obtenido tras la inyección del patrón 10-HDA derivatizado en el GC-FID, el cual posee un tiempo de retención de 12,39 min, tal como lo indica la flecha.

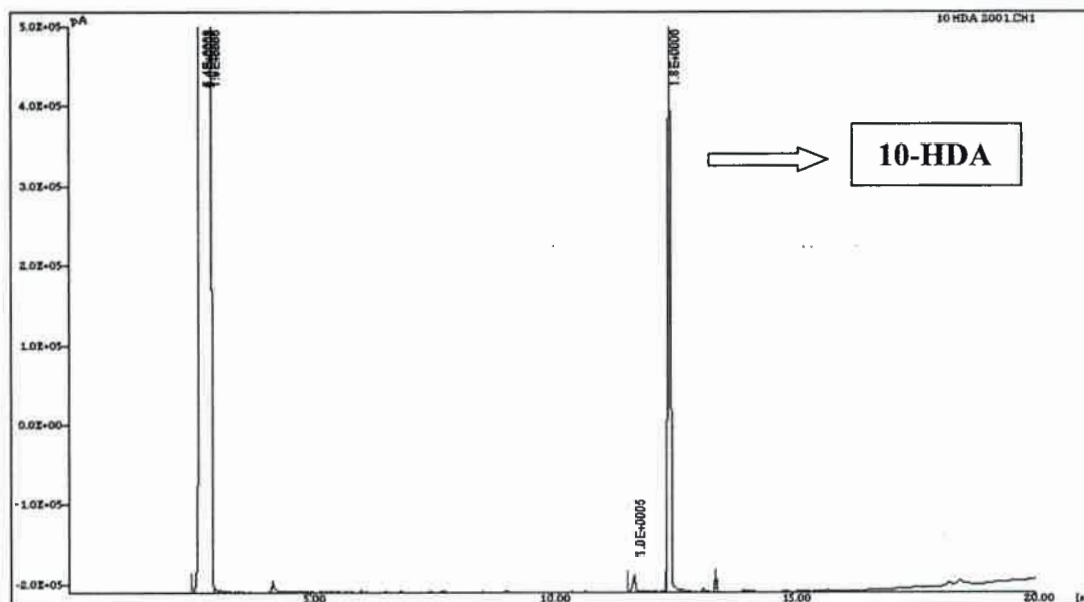


Figura 36: Cromatograma obtenido tras la inyección del patrón 10-HDA en GC-FID

Mediante estos cromatogramas se pudo comprobar que el principal componente en el EE de la JR C es el ácido 10-hidroxi-2-decenoico. La adulteración con miel ocurre con frecuencia causando un incremento en la concentración de azúcares y una disminución de la concentración de proteínas y lípidos en la jalea real. Para comprobar que la calidad y la autenticidad de la jalea real permanezcan inalteradas se utiliza la determinación del 10-HDA. Este lípido sólo se encuentra naturalmente en la jalea real y por ello puede utilizarse como un indicador de autenticidad. Sin embargo, los valores límites del contenido de 10-HDA descritos en la literatura para la jalea real son muy amplios exigiéndose, en general, un valor superior al 1,4% en muestras frescas y 3,5% en muestras liofilizadas (Sabatini y col., 2009). El contenido de 10-HDA disminuye con el almacenamiento (Antinelli, 2003). Por lo tanto, la determinación de los ácidos grasos totales, como se llevó a cabo en estudios italianos, podría ser quizás una mejor alternativa que la sola determinación del contenido de 10-HDA (Lercker y col., 1981; Lercker y col., 1993). Debido a que el 10-HDA es una sustancia activa de la jalea real y

reconociendo su importancia relacionada con la determinación de la calidad de la misma, Bloodworth y col, en 1995, propusieron un método para su determinación usando HPLC. Genc y Aslan, en 1999, utilizaron el mismo método para determinar el contenido de 10-HDA en muestras de jalea real pura de Turquía y de China, así como también en productos elaborados con el agregado de la misma. Los resultados indican que dicho método es rápido y apropiado para la determinación del principal ácido graso de la jalea real. Por otro lado, García-Amoedo y Almeida-Muradian en 2003, utilizaron HPLC para determinar el contenido de 10-HDA en muestras de jalea real brasileras. Los hidroxí-ácidos, sobre todo aquellos conteniendo diez átomos de carbono, como el 10-HDA, han sido identificados como los responsables de importantes actividades biológicas vinculadas a las estrategias de desarrollo de la colmena. La identificación de esta fracción, en particular en lo que respecta al patrón y al análisis cuantitativo de ácidos orgánicos, se cree que representan los criterios de elección para definir la autenticidad de jalea real y la presencia en la misma de otros productos, ya sean alimentos o cosméticos (Sabatini y col., 2009). En el presente estudio, se evaluó la presencia de 10-HDA en una muestra de jalea real, utilizando cromatografía gaseosa con la finalidad de comparar con el correspondiente patrón. Se pudo concluir que la FLA de la JR C está compuesta, principalmente, por el ácido graso 10-HDA, responsable de la actividad antibacteriana observada por la técnica de microdilución en caldo y por estudios de bioautografía.

CONCLUSIONES

♣ Por medio de la caracterización fisicoquímica y organoléptica de las muestras de jalea real estudiadas se concluye que todas cumplen con las exigencias del CAA, lo que asegura su pureza y autenticidad. Todas las muestras de jalea real poseen los carbohidratos exigidos: glucosa, fructosa y sacarosa. Los valores levemente menores obtenidos de azúcares reductores podrían deberse a que sólo se determinó entre ellos glucosa y fructosa. En cuanto a sacarosa los valores se encuentran dentro del intervalo exigido por el CAA.

♣ En el presente trabajo de Tesis se pudo corroborar la hipótesis planteada, demostrándose que las muestras de jalea real obtenidas de diversas regiones de Argentina poseen actividad antibacteriana contra un amplio espectro de bacterias Gram positivo y Gram negativo, aisladas de infecciones superficiales en seres humanos y de mastitis en bovinos, así como también contra bacterias aisladas de diversos orígenes incluyendo cepas bacterianas de referencia.

♣ La técnica de difusión en disco no puede ser utilizada para evaluar actividad antibacteriana de jalea real, ya que no es posible observar halos de inhibición del crecimiento debido, probablemente, a problemas de difusión o absorción de la muestra en los discos. Por otra parte, el ensayo realizado por la técnica de dilución en tubo permitió evaluar la actividad antibacteriana de las muestras de jalea real ensayadas, demostrando que las mismas ejercen efectos bacteriostáticos y no bactericidas, debido a que existen amplias diferencias entre las concentraciones necesarias para inhibir el crecimiento de las cepas bacterianas estudiadas y las concentraciones que se requieren para eliminarlas.

♣ Por medio de la realización de la técnica de difusión en pozo se concluye que las bacterias Gram positivo son más sensibles a las muestras de jalea real que las Gram negativo. Las cepas bacterianas pertenecientes a los géneros *Enterococcus* y *Streptococcus*, respectivamente aisladas de infecciones superficiales en seres humanos y de mastitis en bovinos, fueron más resistentes a todas las muestras de jalea real ensayadas que las cepas del género *Staphylococcus*, aisladas de casos mastitis en bovinos. Las cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a la meticilina, aisladas de

mastitis en bovinos, son sensibles a todas las muestras de jalea real estudiadas. Además, estas muestras ejercen un efecto antibacteriano sobre *Pseudomonas aeruginosa*, bacteria muy resistente a antibióticos convencionales. La muestra JR C es la única con efecto inhibitorio del crecimiento sobre la totalidad de las cepas bacterianas utilizadas.

♣ Del análisis estadístico de los valores de CIM obtenidos por la técnica de difusión en pozo se concluye que el grupo correspondiente al género *Staphylococcus* resulta más sensible con respecto a los otros tres grupos (*Enterococcus sp.*, *Streptococcus sp.* y bacterias Gram negativo), independientemente del lugar de procedencia de la jalea real. De este análisis también se concluye que las muestras de jalea real provenientes de diferentes regiones geográficas de la Argentina poseen variabilidad en cuanto a su actividad antibacteriana sobre cepas aisladas de infecciones superficiales en seres humanos y de mastitis en bovinos. Así, JR C y JR NG fueron las que tuvieron en promedio menor CIM, siendo por lo tanto las muestras más activas; por el contrario, las muestras JR LP y JR R tuvieron en promedio la mayor CIM, siendo entonces las menos activas.

♣ La técnica de microdilución en caldo, empleando el colorante vital cloruro de 2,3,5 - trifenil tetrazolio como indicador del crecimiento bacteriano, puede ser utilizada para evaluar la actividad antibacteriana de muestras de jalea real. Por el contrario, la resarzurina no puede ser utilizada para dicho fin, debido a que la jalea real la reduce por sí misma, impidiendo la visualización del efecto inhibitorio.

♣ Tras realizar las correspondientes extracciones por Soxhlet, se obtiene una mayor cantidad de lípidos polares utilizando éter etílico como solvente (extracto etéreo) y una menor cantidad de lípidos no polares al utilizar hexano (extracto hexánico). Por medio de la realización de la técnica de difusión en pozo se concluye que los extractos etéreos de las muestras de jalea real ejercen mayor actividad antibacteriana que sus correspondientes extractos desgrasados.

♣ Por medio de la realización de cromatografía en capa delgada se observan cuatro bandas bien definidas en los extractos etéreos de las muestras JR C y JR NG y en el

extracto hexánico de la muestra JR C. Cuando ambos extractos lipídicos se evaluaron por la técnica de bioautografía se demostró que los componentes de mayor polaridad (que son los más retenidos por la fase estacionaria) poseen actividad antibacteriana.

♣ La fracción lipídica activa del extracto etéreo de la JR C, que coincide con el R_f del patrón 10-HDA, contiene una sola banda, que al estudiarse por cromatografía gaseosa con detector de ionización de llama demuestra un espectro limpio en el cual se observa un único componente cuyo tiempo de retención es igual al del patrón 10-HDA. Por lo tanto, se concluye que la fracción lipídica activa del extracto etéreo de la JR C está compuesta por dicho ácido graso, que es exclusivo de la jalea real y tiene propiedades antibióticas que ya fueron demostradas en estudios previos.

♣ A excepción de *Streptococcus agalactiae* 1, todas las demás cepas Gram positivo estudiadas por técnica de microdilución en caldo son sensibles a las concentraciones evaluadas de la fracción lipídica activa del extracto etéreo de la JR C y del 10-HDA. Por el contrario, las cepas bacterianas Gram negativo que fueron estudiadas son todas resistentes.

♣ Los resultados obtenidos constituyen la primera evidencia del uso de jalea real y su extracto lipídico como agentes antibacterianos frente a cepas bacterianas causantes de infecciones superficiales en humanos y mastitis bovina e indican la elevada sensibilidad que presentan dichas bacterias frente a productos de origen natural. Debido a que se evaluó individualmente la actividad antibacteriana de la fracción lipídica activa del extracto etéreo de la JR C y del ácido 10-hidroxi-2-decenoico, observándose que éste último sería el principal responsable de dicha bioactividad, se propone la utilización de jalea real y/o de sus extractos lipídicos como tratamiento alternativo y natural de infecciones superficiales en seres humanos y de mastitis en bovinos.

-Proyecciones futuras

Realizar un estudio comparativo de los mecanismos de acción de la fracción activa del extracto etéreo de la jalea real y del ácido 10-hidroxi-2-decenoico sobre bacterias causantes de infecciones superficiales en seres humanos y de mastitis en bovinos, planteando como posible hipótesis que, probablemente, éste ácido graso ejerce su acción sobre las membranas celulares de las bacterias.

ANEXO I

Medios de cultivo

a- Agar Cerebro Corazón (ACC) (Britania)

Fórmula (en gramos)	
Infusión de cerebro de ternera	200,0
Infusión corazón vacuno	250,0
Peptona	10,0
Cloruro de sodio	5,0
Glucosa	2,0
Fosfato disódico	2,5
Agar-agar	15,0
Agua destilada	1000 mL
pH final: 7,4 ± 0,2	

b- Caldo Cerebro Corazón (CCC) (Britania)

Fórmula (en gramos)	
Infusión de cerebro de ternera	200,0
Infusión corazón vacuno	250,0
Peptona	10,0
Cloruro de sodio	5,0
Glucosa	2,0
Fosfato disódico	2,5
Agua destilada	1000 mL
pH final: 7,4 ± 0,2	

c- Caldo Cerebro Corazón con glicerol al 20%

Fórmula (en gramos)	
Caldo cerebro corazón	3,7
Glicerol	20 mL
Agua destilada	100 mL
pH final: 7,4 ± 0,2	

d- Agar Crecimiento *Streptococcus* (ACS)

Fórmula (en gramos)	
Caldo Tripticasa Soya	30,0
Extracto de levadura	7,5
Sacarosa	5,0
Cloruro de sodio	5,0
Glucosa	2,0
Fosfato dipotásico	5
Agar-agar	15,0
Agua destilada	1000 mL
pH final: 7,4 ± 0,2	

e- Leche Extracto de Levadura (LEL)

Fórmula (en gramos)	
Leche descremada	10,0
Extracto de levadura	0,5
Glucosa	1,0
Glicerol	10 mL
Agua destilada	100 mL
pH final: 7,4 ± 0,2	

f- Caldo Tripticasa Soya (CTS) (Britania)

Fórmula (en gramos)	
Tripteína	17,0
Peptona de soya	3,0
Cloruro de sodio	5,0
Fosfato dipotásico	2,5
Glucosa	2,5
Agua destilada	1000 mL
pH final: 7,3 ± 0,2	

g- Agar Tripticasa Soya (ATS) (Britania)

Fórmula (en gramos)	
Tripteína	17,0
Peptona de soya	3,0
Cloruro de sodio	5,0
Fosfato dipotásico	2,5
Glucosa	2,5
Agar-agar	15,0
Agua destilada	1000 mL
pH final: 7,3 ± 0,2	

h- Agar Müeller-Hinton (AMH) (Britania)

Fórmula (en gramos)	
Infusión de carne	300,0
Peptona ácida de caseína	17,5
Almidón	1,5
Agar-agar	15,0
Agua destilada	1000 mL
pH final: 7,3 ± 0,2	

i- Caldo Müeller-Hinton (CMH) (Britania)

Fórmula (en gramos)	
Infusión de carne	300,0
Peptona ácida de caseína	17,5
Almidón	1,5
Agua destilada	1000 mL
pH final: 7,3 ± 0,2	

j- Solución de agar-agar al 0,15 % (p/v)

Fórmula (en gramos)	
Agar-agar (Britania)	0,15
Agua destilada	100 mL

k- Agar Müeller-Hinton semisólido

Fórmula (en gramos)	
Caldo Müeller-Hinton	2,2
Agar-agar	0,6
Agua destilada	100 mL

Reactivos, soluciones y solventes

- a- KOH 0,086 N
- b- Biftalato de potasio seco (PM y Peq: 204,22 g)
- c- Solución de fenolftaleína al 1% (p/v)
- d- Solución de NaOH 0,1 N
- e- Solución patrón de glucosa $1,0 \times 10^{-4}$ M
- f- Solución patrón de fructosa $1,0 \times 10^{-4}$ M
- g- Solución patrón de sacarosa $1,0 \times 10^{-4}$ M
- h- Colorantes para tinción de Gram:

- Cristal Violeta
- Lugol (I₃K)
- Alcohol
- Safranina
- i- Cloruro de 2,3,5 - trifenil tetrazolio al 0,05 % (p/v) (Merck)
- j- Éter de petróleo pro-análisis (Sintorgan)
- k- Éter etílico pro-análisis (Sintorgan)
- l- Hexano pro-análisis (Cicarelli)
- m- Metanol grado HPLC (J. T. Baker)
- n- Dimetil sulfóxido (Sintorgan)
- o- Agua destilada
- p- Agua HPLC (Sintorgan)

BIBLIOGRAFÍA

- **Abdelatif, M.; Yakoot, M.; Etmaan, M.** (2008). Safety and efficacy of a new honey ointment on diabetic foot ulcers: a prospective pilot study. *Journal of Wound Care*. 17 (3): 108-110.
- **Almeida, R.; Mathews, K.; Cifrian, E.; Guidry, A.; Oliver, S.** (1996). *Staphylococcus aureus* invasion of bovine mammary epithelial cells. *Journal of Dairy Science*. 79:1021-1026.
- **Alonso Gaona, I.** (2006). Prevalencia de mastitis clínica en el ganado lechero de Téjaro, Municipio de Tarímbaro Michoacán. Servicio profesional presentado en la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia para obtener el título de Médico Veterinario y Zootecnista.
- **Altöparlak, U.; Aktas, F.; Selebi, D.; Özkurt, Z.; Akcay, M.** (2005). Prevalence of metallo- β -lactamase among *Pseudomonas aeruginosa* and *Actinobacter baumannii* isolated from burn wounds and in vitro activities of antibiotic combinations against these isolates. *Burns*. 31: 707-710.
- **Allen, K. L.; Molan, P. C.; Reid, G. M.** (1991). A survey of the antibacterial activity of some New Zealand honeys. *Journal of Pharmacology*. 43: 817-822.
- **Andresen, H.** (2001). Mastitis: prevención y control. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 12(2): 55-64.
- **Antinelli, J. F.; Davico, R.; Rognone, C. Faucon, J. P.; Lizzani-Cuvelier, L.** (2002). Application of solid/liquid extraction for the gravimetric determination of lipids in Royal Jelly. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50: 2227-2230.
- **Antinelli, J.; Zeggane, S.; Davico, R.; Rognone, C.; Faucon, J.; Lizzani, L.** (2003) Evaluation of (*E*)-10-hydroxydec-2-enoic acid as a freshness parameter for royal jelly. *Food Chemistry*. 80: 85-89.
- **AOAC.** (1990). *Association of Official Analytical Chemists - Official Methods of Analysis* 15th ed. Arlington, USA.
- **Arciola, C.; Baldassarri, L.; Campoccia, D.; Creti, R.; Pirini, V.; Huebner, J.; Montanaro, L.** (2008). Strong biofilm production, antibiotic multi-resistance and high *gelE* expression in epidemic clones of *Enterococcus faecalis* from orthopaedic implant infections. *Biomaterials*. 29: 580-586.

- **Bachanova, K.; Klaudiny, J.; Kopernicky, J.; Simuth, J.** (2002) "Identification of honeybee peptide active against *Paenibacillus larvae larvae* through bactericidal growth-inhibition assay on polyacrylamide gel" *Apidologie*. 33: 259-269.
- **Barkema, H.; Schukken, Y.; Lam, T.; Beiboer, M.; Wilmink, H.; Benedictus, G.; Brand, A.** (1998). Incidence of clinical mastitis in dairy herds grouped in three categories by bulk milk somatic cell counts. *Journal of Dairy Science*. 81: 411-419.
- **Barnea, Y.; Carmeli, Y.; Neville, L.; Kahel-Reifer, H.; Eren, R.; Dagan, S.; Navon-Venezia, S.** (2009). Therapy with anti-flagellin A monoclonal antibody limits *Pseudomonas aeruginosa* invasiveness in a mouse burn wound sepsis model. *Burns*. 35: 390-396.
- **Basualdo, J. A.; Coto, C. E.; de Torres, R. A.** (1996). "Microbiología Biomédica" Editorial: Atlante S.R.L. Buenos Aires, Argentina.
- **Basualdo, C.; Sgroy, V.; Finola, M.; Marioli, J.** (2007). Comparison of the antibacterial activity of honey from different provenance against bacteria usually isolated from skin wounds. *Veterinary Microbiology*. 124: 375-381.
- **Bauer, A.; Kirby, W.; Sherris, J.; Turck, M.** (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*. 45: 493-496.
- **Bedwell, J.; Kairo, S.; Corbel, M.** (2001). Evaluation of a tetrazolium salt test to determine absence of live mycobacteria in tuberculin purified protein derivative. *Biologicals*. 29: 3-6.
- **Bengtsson, B.; Unnerstad, H.; Ekman, T.; Artursson, K.; Nilsson-Ost, M.; Waller, K.** (2009). Antimicrobial susceptibility of udder pathogens from cases of acute clinical mastitis in dairy cows. *Veterinary Microbiology*. 136: 142-149.
- **Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.** (1994). Edited by Jhon G. Holtt. Williams & Wilkins, 9^{na} edition. Baltimore, United States of America.
- **Bilikova, K.; Simuth, J.** (2001). Isolation of a peptide fraction from honeybee royal jelly as a potential antifoulbrood factor. *Apidologie*. 32: 275-283.
- **Bilikova, K.; Hanes, J.; Nordhoff, E.; Saenger, W.; Klaudiny, J.; Simuth, J.** (2002). Apisimin, a new serine-valine-rich peptide from honeybee (*Apis mellifera* L.) royal jelly: purification and molecular characterization. *Federation of European Biochemical Societies Letters*. 528: 125-129.

- **Bloodworth, B.; Harn, C.; Hock, C.; Boon, Y.** (1995). Liquid chromatographic determination of trans-10-hydroxy-2-decenoic acid content of commercial products containing royal jelly. *Journal of AOAC International*. 78 (4): 1019-1023.
- **Blum, M.; Novak, A.; Taber, S.** (1959). 10-hydroxy-D2 decenoic acid, an antibiotic found in royal jelly. *Science*. 130: 452-453.
- **Bogdanov, S.** (1984). Characterization of antibacterial substances in honey. *Lebensmittel-Wissenschaft und- Technologie*. 17: 74-76.
- **Bogdanov, S.** (1997). Nature and origin of the antibacterial substances in honey. *Lebensmittel-Wissenschaft und- Technologie*. 30: 748-753.
- **Boman, H.** (1991). Antibacterial peptides: a key component needed in immunity. *Cell*. 65: 205-207.
- **Boman, H.** (1995). Peptide antibiotics and their role in innate immunity *Annual Review of Immunology* 13: 61-92.
- **Bonomi, A.; Marletto, F.; Luccelli, L.; Anghinetti, A.; Bonomi, A.; Sabbioni, A.** (1986). Composizione chimico-bromatologica della gelatina reale in rapporto alla flora nettarifera e pollinifera. *Rivista Italiana di Scienza Degli Alimenti*. 15: 53-62.
- **Boukraâ, L.** (2008). Additive activity of royal jelly and honey against *Pseudomonas aeruginosa*. *Alternative Medicine Review*. 13(4): 330-333.
- **Boukraâ, L.; Niar, A.; Benbarek, H.; Benhanifia, M.** (2008). Additive action of royal jelly and honey against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medicinal Food*. 11: 190-192.
- **Boukraâ, L.; Meslem, A.; Benhanifia, M.; Hammoudi, S.** (2009). Synergistic effect of starch and royal jelly against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Journal of Alternative and Complementary Medicine*. 15(7): 755-757.
- **Boukraâ, L.; Sulaiman, S.** (2009). Rediscovering the antibiotics of the hive. *Recent Patent on Anti-infective Drug Discovery*. 4(3): 206-213.
- **Bullet P.; Hetru, C.; Dimarcq, J.; Hoffman, D.** (1999). Antimicrobial peptides in insects: structure and function. *Development and Comparative Immunology*. 23: 329-344.
- **Bunting, C. M.** (2001). The production of hydrogen peroxide by honey and its relevance to wound healing. MSc. Thesis. University of Waikato.

- **Burvenich, C.; Van Merris, V.; Mehrzad, J.; Diez-Fraile, A.; Duchateau, L.** (2003). Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factors. *Veterinary Research*. 34(5): 521-564.
- **Burvenich, C.; Monfardini, E.; Mehrzad, J.; Capuco, A.V.; Paape, M.J.** (2004). Role of neutrophil polymorphonuclear leukocytes during bovine coliform mastitis: physiology or pathology. *Verhandelingen - Koninklijke Academie voor geneeskunde van België*. 66: 97-150.
- **Calderón, A.; Rodríguez, V.** (2008). Prevalencia de mastitis bovina y su etiología infecciosa en sistemas especializados en producción de leche en el altiplano cundiboyacense (Colombia). *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 21: 582-589.
- **Calvinho, L.; Delgado, A.; Vitulich, C.; Occhi, H.** (1991). Susceptibilidad in vitro a los antimicrobianos de microorganismos aislados a partir de mastitis clínicas de la cuenca lechera santafesina. *Veterinaria Argentina*. 8: 677-680.
- **Calvinho, L.; Tirante, L.** (2005). Prevalencia de microorganismos patógenos de mastitis bovina y evolución del estado de salud de la glándula mamaria en Argentina en los últimos 25 años. *Revista FAVE, Sección Ciencias Veterinarias*. pp. 1-8.
- **Calvinho, L.** (2007). Control de mastitis causadas por estreptococos ambientales. *Jornada APROCAL – INTA Rafaela*. pp. 1-11.
- **Cao, L.; Si, J.; Liu, Y.; Sun, H.; Jin, W.; Li, Z.; Zhao, X.; Pan, R.** (2009). Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant properties of *Mosla chinensis* Maxim. *Food Chemistry*. 115: 801-805.
- **Carrasco-Pancorbo, A.; Navas-Iglesias, N.; Cuadros-Rodríguez, L.** (2009). From lipids análisis towards lipidomics, a new Challenger for the analytical chemistry of the 21st century. Part I: Modern lipid analysis. *Trends in Analytical Chemistry*. 28(3): 263-278.
- **Cerdá, R.; Xavier, J.; Sansalone, P.; De La Sota, R.; Rosenbush, R.** (2000). Aislamiento de *Mycoplasma bovis* a partir de un brote de mastitis bovina en una vaquería de la Provincia de Buenos Aires. Primera comunicación en la República Argentina. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 42: 7-11.
- **Chen, C.; Chen, S. Y.** (1995). Changes in protein components and storage stability of royal jelly under various conditions. *Food Chemistry*. 54: 195-200.

- **Chomnawang, M.; Surassmo, S.; Wongsariya, K.; Bunyaphratsara, N.** (2009). Antibacterial Activity of Thai Medicinal Plants against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Fitoterapia*. 80: 102-104.
- **Código Alimentario Argentino actualizado.** (2010a). Capítulo X: Alimentos azucarados, artículos 782 (Res. 2256, 16.12.85) y 783 (Res. 2256, 16.12.85).
- **Código Alimentario Argentino actualizado.** (2010b). Capítulo X: Alimentos azucarados, artículo 784 (Res. 3363, 30.10.79).
- **Collins, C. H.; Lyne, P. M.; Grange, J. M.** (1995). "Microbiological Methods" Edited by Butterworth Heinemann, 7th edition. London, Great Britain. Chapter 12: Antimicrobial susceptibility tests. pp. 178-205.
- **Conde-Estévez, D.; Sorli, L.; Morales-Molina, J.; Knobel, H.; Terradas, R.; Mateu-de Antonio, J.; Horcajada, J.; Grau, S.** (2010). Características clínicas diferenciales entre las bacteriemias por *Enterococcus faecalis* y *Enterococcus faecium*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 28(6): 342–348.
- **Contreras, A.; Sierra, D.; Sánchez, A.; Corrales, J.; Marco, J.; Paape, M.; Gonzalo, C.** (2007). Mastitis in small ruminants. *Small Ruminant Research* 68: 145–153.
- **Cordiés Jackson, L.; Machado Reyes, L.; Hamilton Cordiés, M.** (1998). Principios generales de la terapéutica antimicrobiana. *Acta Médica*. 8(1): 13-27.
- **Cooper, R.; Molan, P.; Harding, K.** (1999). Antibacterial activity of honey against strains of *Staphylococcus aureus* from infected wounds. *Journal of the Royal Society of Medicine*. 92: 283-285.
- **Cruz, C.; Estepa, C.; Hernández, L.; Sanabria, V.** (2007). Identificación de bacterias causantes de mastitis bovina y su resistencia ante algunos antibacterianos. *Actual Divulgación Científica*. 1: 81-91.
- **Cruzado Razco, L.; Gutiérrez Calderón, D. P; Ruiz Reyes, S. G.** (2007). Chemical test effect of antibiotics in vitro of the honey bee on gramnegative and grampositive microorganisms. *Revista Médica Vallejana*. 4(2): 95-108.
- **Daza Pérez, R. M.** (1998). Resistencia bacteriana a antimicrobianos: su importancia en la toma de decisiones en la práctica diaria. *Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud*. 22: 57-67.

- **Devienne, K.; Raddi, M.** (2002). Screening for antimicrobial activity of natural products using a microplate photometer. *Brazilian Journal of Microbiology*. 33: 166-168.
- **Devriese, L.; Van Damme, L.; Fameree, L.** (1972). Methicillin (cloxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine mastitis cases. *Zentralbl Veterinarmed B*. 19: 598-605.
- **Dieser, S.** (2011). “Estudios fenotípicos y genotípicos de patógenos asociados a mastitis bovina de tambos de la cuenca lechera central de Argentina”. Tercer informe de avance de Tesis Doctoral. Defensa de Tesis en Marzo 2012.
- **Djabri, B.; Barielle, N.; Beaudeau, F.; Seegers, H.** (2002). Quarter milk somatic cell count in infected dairy cows: a meta-analysis. *Veterinary Research*. 33: 335-357.
- **Dmitriev, A.; Shakleina, E.; Tkacikova, L.; Mikula, I.; Totolian, A.** (2002). Genetic heterogeneity of the pathogenic potentials of human and bovine group B streptococci. *The Journal of Veterinary Medical Science*. 47: 291-295.
- **Douglas, V.; Fenwick, S.; Pfeiffer, D.; Williamson, N.; Holmes, C.** (2000). Genomic typing of *Streptococcus uberis* isolates from cases of mastitis in New Zealand dairy cows, using pulsed-field gel electrophoresis. *Veterinary Microbiology*. 75: 27-41.
- **Dryden, M.** (2009). Skin and soft tissue infection: microbiology and epidemiology. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 34(51): 52-57.
- **Dustmann, J. H.** (1979). Antibacterial effect of honey. *Apiacta*. 14: 7-11.
- **Ekman, T.; Astrom, G.; Funke, H.** (1994). Mesuares taken by veterinarians in Sweden in cases of bovine mastitis. *Acta Veterinsria. Scandinavica*. 35: 329-335.
- **Eshraghi, S.** (2005). An evaluation of the potent inhibitory effects of royal jelly fractions against *Streptomyces* bacteria. *Pakistan Journal of Medical Science*. 21(1): 63-68.
- **Expo Ciencia.** Abeja y sus productos: Organización de la colmena. Conducta social. Polinización. Apicultura. 2002. [En línea]. Disponible en: <http://www.abeja-y-sus-productos.html>.
- **Ferreira de Oliveira, G.; Cardoso Furtado, N.; da Silva Filho, A.; Gomes Martins, C.; Kenupp Bastos, J.; Cunha, W.; de Andrade e Silva, M.** (2007).

- Antimicrobial activity of *Syzygium cumini* (Myrtaceae) leaves extract. *Brazilian Journal of Microbiology*. 38: 381-384.
- **Finelgold, S. M.; Baron, E. J.** (1992). "Bailey-Scott. Diagnóstico Microbiológico. Aislamiento e identificación de microorganismos patógenos". Editorial Médica Panamericana, 7^{ma} edición. Buenos Aires, Argentina. Capítulo 36: Determinación de la susceptibilidad de las bacterias a los agentes antimicrobianos; ensayos de agentes antimicrobianos. pp. 513-533.
 - **Fitzgerald, J.; Hartigan, P.; Meaney, W.; Smyth, C.** (2000). Molecular population and virulence factor analysis of *Staphylococcus aureus* from bovine intramammary infection. *Journal of Applied Microbiology*. 88: 1028-1037.
 - **Fontana, R.; Mendes, M. A.; De Souza, B. M.; Konno, K.; Marcondes, L. M.; Malaspina, O.; Palma, M. S.** (2004). Jelleines: a family of antimicrobial peptides from royal jelly of honeybees (*Apis mellifera*). *Peptides*. 25: 919-928.
 - **Fujii, A.; Kobayashi, S.; Ishihama, S.; Yamamoto, H.; Tamura, T.** (1990). Augmentation of wound healing by royal jelly. *Japanese Journal of Pharmacology*. 53 (3): 331-337.
 - **Fujiwara, S.; Imai, J.; Fujiwara, M.; Yaeshima, T.; Kawashima, T.; Kobayashi, K.** (1990). A potent antibacterial protein in royal jelly. Purification and determination of the primary structure of royalisin. *Journal of Biological Chemistry* 265: 11333-11337.
 - **Gaitan, S.; Espinal Marín, P.** (2009). Molecular characterization of extended-spectrum β -lactamases-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in hospitals of the Caribbean Region, Colombia. *Revista Chilena de Infectología*. 26 (3): 239-246.
 - **García, M.; Finola, M.; Marioli, J.** (2010). Antibacterial activity of royal jelly against bacteria capable of infecting cutaneous wounds. *Journal of ApiProducts and ApiMedical Science*. 2(3): 93-99.
 - **García-Amoedo, L.; Almeida-Muradian, L.** (2003). Determination of trans-10-hydroxy-2-decenoic acid (10-HDA) in royal jelly from Sao Paulo State, Brazil. *Ciencia e Tecnologia de Alimentos, Campinas*. 23(Supl): 62-65.
 - **García-Amoedo, L.; Almeida-Muradian, L.** (2007). Physicochemical composition of pure and adulterated royal jelly. *Química Nova*. 30(2): 257-259.

- **Genc, M.; Aslan, A.** (1999). Determination of trans-10hydroxy-2-decenoic acid content in pure royal jelly and royal jelly products by column liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 839: 265-268.
- **Gende, L.; Floris, I.; Fritz, R., Eguras, M.** (2008). Antimicrobial activity of cinnamon (*Cinnamomun zeylanicum*) essential oils and its main components against *Paenibacillus larvae* from Argentine. *Bulletin of Insectology*. 61(1): 1-4.
- **Gentillini, E.; Denamile, G.; Godaly, M.** (1995). Mastitis bovina: Tipificación del género *Staphylococcus*. *Veterinaria Argentina*. 12: 384-386.
- **González Gascón, R.; Del Dedo Torre, P.** (2004). Actualización sobre el uso de miel en el tratamiento de úlceras y heridas. *Revista Electrónica Semestral de Enfermería* N° 4.
- **González, M; Marioli, J.** (2010). Antibacterial activity of water extracts and essential oils of various aromatic plants against *Paenibacillus larvae*, the causative agent of American Foulbrood. *Journal of Invertebrate Pathology*. 104: 209–213.
- **Goodall, R.; Levi, A.** (1946). A microchromatographic method for the detection and approximate determination of the different penicillins in a mixture. *Nature*. 158: 675-676.
- **Gruet, P.; Maincent, P.; Berthelot, X.; Kaltsatos, V.** (2001). Bovine mastitis and intramammary drug delivery: review and perspectives. *Advanced Drug Review*. 50: 245–259.
- **Guérin-Faubleé, V.; Tardy, F.; Bouveron, C.; Carret, G.** (2002). Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus* species isolated from clinical mastitis in dairy cows. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 19: 219–226.
- **Gunay, A.; Gunay, U.** (2008). Effects of Clinical Mastitis on Reproductive Performance in Holstein Cows. *Acta Veterinaria. Brno*. 77: 555-560.
- **Halcón, L.; Milkus, K.** (2004). *Staphylococcus aureus* and wounds: a review of tea tree oil as a promising antimicrobial. *American Journal of Infection Control*. 32: 402-408.
- **Han, G.; Martinez, L.; Radu Mihu, M.; Friedman, A.; Friedman, J.; Nosanchuk, J.** (2009). Nitric oxide releasing nanoparticles are therapeutic for *Staphylococcus aureus* abscesses in a murine model of infection. *Plos One*. 4(11): 1-7.

- **Heinrichs, A.; Costello, S.; Jones, C.** (2009) Control of heifer mastitis by nutrition. *Veterinary Microbiology*. 134: 172–176.
- **Heringstad, B.; Klemetsdal, G.; Ruane, J.** (2000). Selection for mastitis resistance in dairy cattle: a review with focus on the situation in the Nordic countries. *Livestock Production Science*. 64: 95-106.
- **Hogan, J.; Smith, K.** (2003). Coliform mastitis. *Veterinary Research*. 34: 507–519.
- **Holden, C.** (1989). Entomologists wane as insect wax. *Science*. 246 (4931): 754–756.
- **Holleman, D.; Kelly, L.; Jacobs, M.; Appelbaum, P.** (2002). In vitro anti-anaerobic activity of the cephalosporin derivative RWJ 54428, compared to seven other compounds. *Clinical Microbiology and Infections*. 8: 813-822.
- **Hornitzky, M.** (1998). The Patogenicity of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* spores and vegetative cells to honey bee (*Apis mellifera*) colonies and their susceptibility to royal jelly. *Journal of Apicultural Research*. 37(4): 267-271.
- **Hsueh, P.; Chen, W.; Luh, K.** (2005). Relationships between antimicrobial use and antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria causing nosocomial infections from 1991-2003 at a university hospital in Taiwan. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 26: 463-472.
- **Isidorov, V.; Czyzewska, U.; Jankowska, E.; Bakier, S.** (2011). Determination of royal jelly acids in honey. *Food Chemistry*. 124: 387-391.
- **Islam, N.; Parveen, S.; Nakazawa, N.; Marston, A.; Hostettmann, K.** (2003). Bioautography with the fungus *Valsa ceratosperma* in the search for antimycotic agents. *Pharmaceutical. Biology*. 41: 637-640.
- **Ito, T.; Katayama, Y.; Asda, K.; Mori, N.; Tsutsumimoto, K.; Tiensasitorn, C.; Hiramatsu, K.** (2001). Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents of Chemotherapy*. 45: 1323-1336.
- **Jones, M.; Karlowsky, M.; Draghi, D.; Thornsberry, C.; Sahm, D.; Nathwani, D.** (2003). Epidemiology and antibiotic susceptibility of bacteria causing skin and soft tissue infections in the USA and Europe: a guide to appropriate antimicrobial therapy. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 22: 406-419.

- **Kalemba, D.; Kunicka, A.** (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. A review. *Current Medicinal Chemistry*. 10: 813-829.
- **Keefe, G.** (1997). *Streptococcus agalactiae* mastitis: a review. *Canadian Veterinary Journal*. 38: 429-437.
- **Koneman, E.** (1999). "Diagnóstico Microbiológico". Editorial Médica Panamericana, 5^{ta} edición. Buenos Aires, Argentina. Capítulo 15: Pruebas de sensibilidad a agentes antimicrobianos. pp. 763-832.
- **Koya-Miyata, S.; Okamoto, I.; Ushio, S.; Iwaki, K.; Ikeda, M.; Kurimoto, M.** (2004). *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 68, 763.
- **Krell, R.** (1996). Value-added products from beekeeping. *FAO Agricultural Services Bulletin. Rome: Food and Agriculture Organization*. 124: 87-113.
- **Kwakman, P.; te Velde, A.; de Boer, L.; Speijer, D.; Vandenbroucke-Grauls, C.; Zaat, S.** (2010). How honey kills bacteria. *The Federation of American Societies for Experimental Biology (FASEB) Journal*. 24(7): 2576-2582.
- **Lammers, A.; Van Vorstenbosch, C.; Erkens, J.; Smith, H.** (2001). The major bovine mastitis pathogens have different cell tropisms in cultures of bovine mammary gland cells. *Veterinary Microbiology*. 80: 255-265.
- **Lee, S.; Kim, J.; Jeong, J.; Park, Y.; Bai, G.; Lee, E.; Lee, M.; Chang, C.** (2007). Evaluation of the broth microdilution method using 2,3-diphenyl-5-thienyl-(2)-tetrazolium chloride for rapidly growing mycobacteria susceptibility testing. *Journal of Korean Medicinal Science*. 22: 784-790.
- **Leite Rodrigues, K.; Gaudino Caputo, L.; Tavares Carvalho, J.; Evangelista, J.; Schneedorf, J.** (2005). Antimicrobial and healing activity of kefir and kefir extract. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 25: 404-408.
- **Lercker, G.; Capella, P.; Conte, L.; Giordani, G.** (1981). Components of Royal Jelly: I. Identification of organic acids. *Lipids*. 16(12): 912-919.
- **Lercker, G.; Vecchi, M.; Piana, L.** (1984). Composition de la fraction lipidique de la gelée des larves d'abeilles reines et ouvrières (*Apis mellifera ligustica*, Spinola) en fonction de l'âge des larves. *Apidologie*. 15: 303-314.
- **Lercker, G.; Savioli, S.; Vecchi, M.; Sabatini, A.; Nanetti, A.; Piana, L.** (1986). Carbohydrate Determination of Royal Jelly by High Resolution Gas Chromatography (HRGC). *Food Chemistry*. 19: 255-264.

- **Lercker, G.; Caboni, M.; Vecchi, M.; Sabatini, A.; Nanetti, A.** (1993). Caratterizzazione dei principali costituenti della gelatina reale. *Apicoltura* 8: 27-37.
- **Lercker, G.** (2003). La gelatina reale: composizione, autenticità ed adulterazione. In Atti del Convegno "Strategie per la valorizzazione dei prodotti dell'alveare". Università degli Studi del Molise; Campobasso; pp. 67-81.
- **Lim, T.; Lim, Y.; Yule, C.** (2009). Evaluation of antioxidant, antibacterial and anti-tyrosinase activities of four *Macaranga* species. *Food Chemistry*. 114: 594-599.
- **Lowy, F.** (1998). *Staphylococcus aureus* infections. *The New England Journal of Medicine*. 339(8): 520-532.
- **Lowy, F.** (2003). Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Investigation*. 111: 1265-1273.
- **Maciá, M.; Juan, C.; Oliver, A.; Hidalgo, O.; Pérez, J.** (2005). Caracterización molecular de un brote por *Enterococcus faecalis* resistente a los glucopéptidos en una unidad de cuidados intensivos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 23(8): 460-463.
- **Mann, C.; Markham, J.** (1998). A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. *Journal of Applied Microbiology*. 84: 538-544.
- **Martinez Ramos, P.; Espinal Marin, P.; Bustos, A.; Mattar Velilla, S.** (2005) Prevalencia de *Klebsiella pneumoniae* y *Escherichia coli* productoras de β -lactamasas de espectro extendido (BLEE), en el Hospital San Jerónimo de Montería. *MedUNAB* 8(1): 15-22.
- **Masoko, P.; Picard, J.; Eloff, J.** (2005). Antifungal activities of six South African *Terminalia* species (*Combretaceae*). *Journal of Ethnopharmacology*. 99: 301-308.
- **Mattos de Oliveira Coelho, S.** (1996). Métodos fenotípicos e genotípicos para identificação de fatores de virulencia e resistencia a oxacilina de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus intermedius* isolados de mastite bovina. Relatório de atividades ejecutadas na Universidad Nacional de Río Cuarto, Projeto Capes/Secyt (44/03). 03 de dezembro de 2005 a 03 de junho de 2006.
- **McCleskey C.; Melampy R.** (1939). Bacterial properties royal jelly of honey bee. *Journal of Economic Entomology*. 32(4): 581-587.

- **Melliou, E.; Chinou, I.** (2005). Chemistry and bioactivity of royal jelly from Greece. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53: 8987-8992.
- **Mendizábal, F. M.** (2005). "Abejas". Editorial: Albatros, 1^{ra} edición. Buenos Aires, Argentina. Capítulo 1: Características de las abejas. pp. 11-14 y 37-42; capítulo 4: Productos que elaboran las abejas. pp. 69-78; capítulo 12: Análisis de la apicultura argentina actual. pp. 219-224; capítulo 13: Los padres de la apicultura moderna. pp. 234.
- **Merl, K.; Abdulmawjood, A.; Lammler, C.; Zschock, M.** (2003). Determination of epidemiological relationships of *Streptococcus agalactiae* isolated from bovine mastitis. *Federation of European Microbiological Societies (FEMS) Microbiology Letters*. 226: 87-92.
- **Miller G., Bartlett P.** (2004). Economic effects of mastitis prevention strategies for dairy producers. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 198: 227-231.
- **Molan, P. C.** (1992). The antimicrobial activity of honey. *Bee World*. 73: 5-28 and 59-76.
- **Molan, P. C.** (1999). The role of honey in the management of wounds. *Journal of Wound Care*. 8: 415-418.
- **Molan, P. C.** (2000). Establishing honey as a recognized medicine. *The Journal of the American Apitherapy Society*. 7(1): 7-9.
- **Molan, P. C.** (2001). Potential of honey in the treatment of wounds and burns. *American Journal of Clinical Dermatology*. 2(1): 9-13.
- **Molan, P.** (2002). Not all honeys are the same for wound healing. *Bulletin of the European Tissue Repair Society*. 9: 5-6.
- **Momchilova, S.; Nikolova-Damyanova, B.** (2008). In "Thin Layer Chromatography in phytochemistry". Edit by Monika Waksmundzka Hajnos, Joseph Sherma & Teresa Kowalska. CRC Press. Taylor & Francis Group. Chromatographic Science Series, Volume 99. Boca Raton, Florida, United States of America. Chapter 12: TLC of Lipids. pp. 277-297.
- **Murat, K.; Gökhan, E.; Sibel, S.; Mürsel, K.** (2009). Effects of sodium fluoride exposure on some biochemical parameters in mice: Evaluation of the ameliorative

- effect of royal jelly applications on these parameters. *Food and Chemical Toxicology* 47: 1184–1189.
- **Nagai, T. ; Sakai, M. ; Inoue, R. ; Inoue, H. ; Suzuki, N.** (2001). Antioxidative activities of some commercially honeys, royal jelly and propolis. *Food Chemistry*. 75 (2): 237-240.
 - **Nagai, T.; Inoue, R.** (2004). Preparation and the functional properties of water extract and alkaline extract of royal jelly. *Food Chemistry*. 84:181-186.
 - **Nasser, S.; Mabrouk, A.; Maher, A.** (2003). Colonization of burn wounds in Ain Shams University burn unit. *Burns*. 29: 229-233.
 - **NCCLS** (1987). Evaluating Production Lots of Dehydrated Mueller-Hinton agar; Proposed Standard M6-P. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, PA, USA.
 - **NCCLS** (1990a). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility test, 4th Edn, Approved Standard M2-A4. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, PA, USA.
 - **NCCLS** (1990b). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically, 2nd Edn, Approved Standard M7-A2, National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, PA, USA.
 - **Nobmann, P.; Smith, A.; Dunne, J.; Henehan, G.; Bourke, P.** (2009). The antimicrobial efficacy and structure activity relationship of novel carbohydrate fatty acid derivatives against *Listeria spp.* and food spoilage microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*. 128: 440–445.
 - **Paape, M.; Mehrzad, J.; Zhao, X.; Detilleux, J.; Burvenich, C.** (2002). Defense of the bovine mammary gland by polymorphonuclear neutrophil leukocytes. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. 7: 109–121.
 - **Pamplona, L.; Azedo, R.; Oliveira, K.; García-Amoedo, L.; Almeida-Muradian, L.** (2004). Physicochemical analyses indicated to the quality control of royal jelly with honey. *Ciencia y tecnología de alimentos*. 24: 608-612.
 - **Park, Y.; Albright, K.; Cai, Z.; Pariza, W.** (2001). Comparison of methylation procedures for conjugated linoleic acid and artifact formation by commercial (trimethylsilyl)diazomethane. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 49: 1158-1164.

- **Pavia, D.; Lampman, G.; Kriz, G.** (1988). "Introduction to organic laboratory techniques. A contemporary approach". Saunders College, 3th edition. Philadelphia, United States of America. Technique 10: Column Chromatography & Technique 11: Thin-Layer Chromatography. pp. 593-629.
- **Peixoto, L. G.; Calabria, L. K.; García, L.; Capparelli, F. E.; Goulart, L. R.; Sousa, M.; Espindola, F. S.** (2009). Identification of major royal jelly proteins in the brain of the honeybee *Apis mellifera*. *Journal of Insect Physiology*. 55: 671-677.
- **Pereira, J.; Bergamo, D.; Pereira, J.; Franca, S.; Pietro, R.; Silva-Sousa, Y.** (2005). Antimicrobial activity of *Arctium lappa* constituents against microorganisms commonly found in endodontic infections. *Brazilian Dental Journal*. 16(3): 192-196.
- **Petti, S.; Tarsitani, G.; Simonetti D'arca, A.** (2008). Antibacterial activity of yoghurt against viridans streptococci in vitro. *Archives of Oral Biology*. 53: 985-990.
- **Phuektes, P.; Mansell, P.; Dyson, R.; Hooper, N.; Dick, J.; Rowning, G.** (2001). Molecular Epidemiology of *Streptococcus uberis* isolates from Dairy Cows with Mastitis. *Journal of Clinical Microbiology*. 39: 1460-1466.
- **Plettner, E.; Slessor, K. N.; Winston, M. L.; Oliver, J. E.** (1996). Caste selective pheromone biosynthesis in honeybees. *Science*. 271: 1851-1853.
- **Plettner, E.; Slessor, K. N.; Winston, M. L.** (1998). Biosynthesis of mandibular acids in honeybees (*Apis mellifera*): de novo synthesis, route of fatty acid hydroxylation and caste selective β -oxidation. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 28: 31-42.
- **Pomeranz, Y.; Meloan, C. E.** (1994). "Food Analysis. Theory and Practice. Chapman & Hall, 3th edition. New York, United States of America. Chapter 37: Lipids. pp. 678-732.
- **Prescott, J. F.; Desmond Baggot, J.** (1988). "Terapéutica antimicrobiana veterinaria". Editorial Acribia, 1^{ra} edición. Zaragoza, España. Capítulo 18: Mastitis Bovina. pp. 371-382.
- **Radostits, O. M.; Gay, C. C.; Blood, D. C.; Hinchcliff, K. W.** (2002). "Medicina Veterinaria. Tratado de las enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino

- y equino”. Editorial: McGraw – Hill Interamericana. 9na. edición. Vol: 1. Madrid, España.
- **Ratanavalachai, T.; Wongchai, V.** (2002). Antibacterial activity of intact royal jelly, its lipid extract and its defatted extract. *Thammasat International Journal of Science and Technology*. 7: 5-12.
 - **Reid, G.** (2001). Probiotic agents to protect the urogenital tract against infection. *American Journal of Clinical Nutrition*. 73 (suppl): 4375-4435.
 - **Rivelli, G.; Rodríguez, C.** (2001). Prevalencia de agentes etiológicos causales de mastitis bovina en la zona noroeste de sta fe y sur de sgo del estero. Respuesta a la sensibilidad antimicrobiana. *Tecnología Láctea Latinoamericana*. 23: 48-53.
 - **Russi, N.; Bantar, C.; Calvino, L.** (2008). Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* causing bovine mastitis in Argentine dairy herds. *Revista Argentina de Microbiología*. 40: 116-119.
 - **Sabatini, A.; Marcazzan, G.; Caboni, M.; Bogdanov, S.; Bicudo De Almeida-Muradian, L.** (2009). Quality and standardisation of royal jelly. *Journal of ApiProducts and ApiMedical Sciences* 1(1): 16-21.
 - **Sado-Kamdem, S.; Vannini, L.; Guerzoni, E.** (2009). Effect of α -linoleic, capric and lauric acid on the fatty acid biosynthesis in *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Food Microbiology*. 129: 288-294.
 - **Salazar-Olivo, L. A.; Paz-González, V.** (2005). Screening of biological activities present in honeybee (*Apis mellifera*) royal jelly. *Toxicology in Vitro*. 19: 645-651.
 - **Sandgren, C.; Persson Waller, K.; Emanuelson, U.** (2008). Therapeutic effects of systemic or intramammary antimicrobial treatment of bovine subclinical mastitis during lactation. *The Veterinary Journal*. 175: 108–117.
 - **Santamaría González, V.; Alvarado Delgadillo, A.** (2002). Flora cutánea como protección y barrera de la piel normal. *Revista del Centro Dermatológico Pascua*. 11(1): 18-21.
 - **Sauerwald N.; Polster J.; Bengsch E.; Niessen L.; Vogel R.** (1998). Combined antibacterial and antifungal properties of water soluble fractions of royal jelly. *Advanced Food Science*. 20(1/2): 46-52.
 - **Sato, M.; Tanaka, H.; Yamaguchi, R.; Kato, K.; Etoh, H.** (2004). Synergistic effects of mupirocin and an isoflavanone isolated from *Erythrina variegata* on

- growth and recovery of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 24: 43-48.
- **Sauerwald N., Polster J., Bengsch E., Niessen L., Vogel R.F.** (1998) Combined Antibacterial and Antifungal Properties of water soluble fractions of Royal Jelly. *Advances in Food Science*. (CMTL) 20(1/2): 46-52.
 - **Sawaya, A.; Souza, K.; Marcucci, M.; Cunha, I.; Shimizu, M.** (2004). Analysis of the composition of brazilian propolis extracts by chromatography and evaluation of their in vitro activity against Gram-positive bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*. 35: 104-109.
 - **Scaramelli, A.; González, Z.** (2005). Epizootiología y diagnóstico de la mastitis bovina. *Manual de Ganadería Doble Propósito*. 9: 328-334.
 - **Schaechter, M.; Medoff, G.; Eisenstein, B.; Guerra, H.** (1994) "Microbiología. Mecanismos de las enfermedades infecciosas. Enfoque mediante resolución de problemas". Editorial Médica Panamericana, 2^{da} edición. Buenos Aires, Argentina. Capítulo 61: Piel y tejidos blandos. pp. 782-793.
 - **Schmidt, J.; Buchmann, S.** (1992). Other products of the hive. In Graham, J M 8ed. *The hive and the honey bee*. Dadant & Sons; Hamilton, Illinois, USA; pp. 927-988 (revised edition).
 - **Schukken, Y.; Grommers, F.; Vandegeer, D.; Brand, A.** (1989). Incidence of clinical mastitis on farms with low somatic-cell counts in bulk milk. *Veterinary Record*. 125: 60-63.
 - **Scott Weese, J.; van Duijkeren, E.** (2010). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. *Veterinary Microbiology*. 140(3-4): 418-429.
 - **Simuth, J.; Bilikova, K.; Kovacova, E.; Kuzmova, Z.; Schroder, W.** (2004). Immunochemical approach to detection of adulteration in honey: physiologically active royal jelly protein stimulating TNF- α release is a regular component of honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52: 2154-2158.
 - **Soca Pérez, M.; Suarez Fernandez, Y.; Soca Pérez, M.; Pestano Oliva, M.; Puron Guzmely, C.** (2005). Evaluación epizootiológica de la mastitis bovina en dos unidades ganaderas de la empresa Pecuaria El Cangre. *Revista electrónica de Veterinaria REDVET*. 6 (8): 1-10.

- **Stocker, A.** (2003). Isolation and characterization of substances from Royal Jelly. Thesis presented at the University of Orleans for the degree of Doctor of Engineering. Discipline: Molecular Biophysics.
- **Tani, H.; Takahashi, S.; Hasumi, K.; Tatefuji, T.; Hongo, Y.; Koshino, H.** (2009). Isolation of (E)-9,10-dihydroxy-2-decenoic acid from royal jelly and determination of the absolute configuration by chemical synthesis. *Tetrahedron: Asymmetry*. 20: 457-460.
- **Tereschuk, M.; Baigori, M.; Abdala, L.** (2004). Antibacterial activity of *Tagetes terniflor*. *Fitoterapia*. 74: 404-406.
- **Tollersrud, T.; Kenny, K.; Reitz, A. J. Jr.; Lee, J. C.** (2000). Genetic and Serologic Evaluation of Capsule Production by Bovine Mammary Isolates of *Staphylococcus aureus* and Other *Staphylococcus* spp. from Europe and the United States. *Journal of Clinical Microbiology*. 38: 2998-3003.
- **Valgas, C.; Machado De Souza, S.; Smania, E.; Smania, S.** (2007). Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Brazilian Journal of Microbiology*. 38: 369-380.
- **Vandeputte-Van Messom, G.; Burvenich, C.; Roets, E.; Massart-Leen, A.; Heyneman, R.; Kremer, W.; Brand, A.** (1993). Classification of newly calved cows into moderate and severe responders to experimentally induced *Escherichia coli* mastitis. *Journal of Dairy Research*. 60(1): 19-29.
- **Varella Coelho, M.; Nascimento, J.; Fagundes, P.; Madureira, D.; De Oliveira, S.; Vasconcelos de Pavia Brito, M.; De Freire Bastos, M.** (2007). Activity of staphylococcal bacteriocins against *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* involved in bovine mastitis. *Research in Microbiology*. 158: 625-630.
- **Vit, P.** (2004). Productos de la colmena recolectados y procesados por las abejas: Miel, polen y propóleos. *Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel*. 35(2): 32-39.
- **Vuong, C.; Otto, M.** (2002). *Staphylococcus epidermidis* infections. *Microbes and Infection*. 4: 481-489.
- **Weins, C.; Jork, H.** (1996). Toxicological evaluation of harmful substances by in situ enzymatic and biological detection in high-performance thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography A*. 750: 403-407.

- **White, J. W.; Subers, M. H.; Schepartz, A. I.** (1963). The identification of inhibine, the antibacterial factor in honey, as hydrogen peroxide and its origin in a honey glucose-oxidase system. *Biochimica et Biophysica Acta*. 73: 57-70.
- **Wilkinson, J.** (2006). In "Modern Phytomedicine. Turning Medicinal Plants into Drugs". Edit by **Ahmad, I.; Aquil, F.; Owais, M.** Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KGaA Press. Weinheim, Germany. Chapter 8: Methods for testing the antimicrobial activity of extracts. pp. 157-171.
- **Yang, X.; Yang, D.; Zhang, W.; Wang, J.; Li, Ch. ; Ye, H. ; Lei, K.; Chen, X.; Shen, N.; Jin, L.; Wang, J.** (2010). 10-Hydroxy-2-decenoic acid from Royal jelly: A potential medicine for RA. *Journal of Ethnopharmacology*. 128: 314-321.
- **Yatsunami, K.; Echigo, T.** (1985). Antibacterial Action of Royal Jelly. *Bulletin of the Faculty of Agriculture Tamagawa University*. 25: 13-22.
- **Yau, Y.; Ho, B.; Tan, N.; Long NG, M.; Ding, J.** (2001). High therapeutic index of factor C sushi peptides: potent antimicrobials against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 45: 2820-2825.
- **Zasloff, M.** (1992). Antibiotic peptides as mediators of innate immunity. *Current Opinion in Immunology*. 4: 3-7.



W1188



21188

U N R C
Biblioteca Central