



**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR ESCUELA DE
CIENCIAS AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES**

**TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR PREVIO A LA OBTENCIÓN
DEL TÍTULO DE INGENIERA EN ZOOTECNIA**

**EFFECTO DEL PROPÓLEO ACUOSO IN VITRO COMO TRATAMIENTO
ALTERNATIVO DE MASTITIS EN BOVINOS DE LECHE.**

MENDIETA SIERRA XIMENA SHIRLEY

TUTOR: Mgs. Santiago Mafla

IBARRA – ECUADOR

Marzo, 2025

Ibarra, 06 de marzo del 2026

CERTIFICACIÓN TUTOR

En mi calidad de Tutor del Trabajo de integración curricular titulado:” EFECTO DEL PROPÓLEO ACUOSO IN VITRO COMO TRATAMIENTO ALTERNATIVO DE MASTITIS EN BOVINOS DE LECHE”, presentado por el estudiante MENDIETA SIERRA XIMENA SHIRLEY con cédula de ciudadanía N° 2100776620, para obtener el Título de ZOOTECNISTA.

Certifico que el trabajo cumple con todos los parámetros establecidos, mediante el cual el estudiante demuestra el desarrollo de competencias en el campo de conocimiento de su profesión con un nivel de argumentación coherente, para ser sometido a la evaluación por parte de los lectores.

Adicionalmente, se adjunta el certificado de porcentaje de originalidad de TURNITIN.



(f): _____

Mgs. Santiago Xavier Mafla Andrade

TUTOR DE TRABAJO

C.C.: 1002658399

PÁGINA DE APROBACIÓN DEL TRIBUNAL

El tribunal examinador, aprueba el presente trabajo en nombre de la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Ibarra:



(f):

Mgs. Santiago Xavier Malfa Andrade

C.C.: 1002658399



(f):.....

PhD Edmundo René Recalde

C.C.: 1001774494



(f):.....

MSc. Christian Andrés Arroyo Benavides

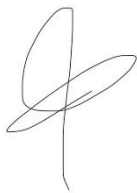
C.C.: 1719831545

Ibarra, marzo el 2026

ACTA DE CESIÓN DE DERECHOS

Yo, *Mendieta Sierra Ximena Shirley* declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 165 del Código Orgánico de Economía Social de los Conocimientos, Creatividad e Innovación, que manifiesta textualmente: “Se reconoce facultad de los autores y demás titulares de derechos de disponer de sus derechos o autorizar las utilidades de sus obras o prestaciones a título gratuito y oneroso, según las condiciones que determinen. Esta facultad podrá ejercerse mediante licencias libres, abiertas y otros modelos alternativos de licenciamiento o la renuncia”.

Ibarra, 06 de marzo del 2026



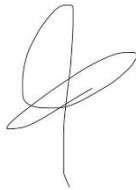
(f): _____

Mendieta Sierra Ximena Shirley

C.C.: 2100776620

AUTORIA

Yo, *Mendieta Sierra Ximena Shirley*, portadora de la cedula de ciudadanía N° 2100776620 declaro que el presente trabajo de investigación es de total responsabilidad de la autora, y eximo expresamente a la Pontificia Universidad Católica del Ecuador Ibarra de posibles reclamos o acciones legales.



(f):

Mendieta Sierra Ximena Shirley

C.C.: 2100776620

DEDICATORIA

A Dios por iluminar mi camino, darme fortaleza en cada desafío y mostrarme que todo esfuerzo hecho con fe tiene recompensa.

A mi querida madre, Ana Yanneth. Mi mejor amiga, mi amor más grande y el corazón que sostiene al mío. Mamita linda, no existen palabras suficientes para describir lo que siento por ti. Tu amor, tu fuerza y tu ternura han sido mi guía en los momentos difíciles y mi alegría en los días de luz. Este logro es para ti, por todo lo que has hecho y dado sin esperar nada a cambio. En cada paso que di, pensé en ti, en tu luz y en tu amor infinito. Eres mi impulso, mi motivo y mi más grande inspiración.

A mi querido padre, a mis hermanas y a mi hermano, gracias por cada palabra de apoyo y cada gesto que, sin necesidad de decirlo, me recordó que siempre puedo contar con ustedes. Gracias a su cariño, paciencia y ejemplo, he encontrado fuerza para seguir adelante incluso cuando los retos parecían insuperables.

A Luanita y a mi pequeño Ezequielito, que fueron mi impulso y mi más grande motivación.

Y a mi querida miga Mayerli, cuya amistad ha sido un regalo invaluable en mi vida, por cada carcajada compartida, cada momento de apoyo y hasta cada lágrima. Tu presencia ha sido un sostén constante, y me siento profundamente agradecida de haber tenido la oportunidad de conocerte y de poder dedicarte también este logro.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, a mi papi y a mi mamita linda, cuyo amor infinito y apoyo incondicional me dieron la fuerza para convertir este gran sueño en realidad. A mis hermanas y a mi querido hermano cuyo amor silencioso lo sentí presente.

Agradezco profundamente a la Dra. Mónica Velasteguí, cuya guía, dedicación y confianza en mi proceso formativo marcaron una diferencia invaluable. Su acompañamiento profesional y humano dejó una huella que llevaré siempre conmigo.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CERTIFICACIÓN TUTOR.....	ii
PÁGINA DE APROBACIÓN DEL TRIBUNAL	iii
ACTA DE CESIÓN DE DERECHOS.....	iv
AUTORIA.....	v
DEDICATORIA	vi
AGRADECIMIENTOS	vii
ÍNDICE DE CONTENIDOS	viii
ÍNDICE DE TABLAS	xi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
CAPITULO I.....	1
INTRODUCCIÓN	1
CAPITULO II	3
OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo General.....	3
2.2. Objetivos Específicos:.....	3
CAPITULO III.....	4
ESTADO DEL ARTE.....	4
3.1 <i>Staphylococcus aureus</i> como Principal Agente Etiológico.....	4
3.1.1 <i>Staphylococcus aureus</i> Participación en Casos Clínicos y Subclínicos.....	5
3.1.2 Mecanismos de Patogenicidad y Persistencia en la Glándula Mamaria.....	7
3.1.3 Desafíos por Resistencia Antimicrobiana en <i>S. aureus</i>	10
3.2 Alternativas naturales a los antibióticos convencionales en el tratamiento de la mastitis bovina.....	11
3.3 Características del propóleo	13
3.3.1 Utilidad del propóleo en animales.....	13
3.3.2 Potencial Terapéutico del Propóleo Acuoso	14
3.3.3 Composición Química y Propiedades Biológicas del Propóleo	14
3.3.4 Mecanismo de Acción del Propóleo Sobre Bacterias Gram Positivas	16
3.4 Estudios In Vitro del Propóleo Frente a <i>Staphylococcus aureus</i>	17
3.5 Función del etanol en el propóleo	18
3.6 Ventajas del Uso de Propóleo Acuoso Frente a Otras Formas de Presentación	19
CAPITULO IV.....	20

MATERIALES Y MÉTODOS	20
4.1. Materiales e insumos.....	20
4.2. Reactivos.....	20
4.2.1 Material Biológico	20
4.2.2 Materiales de Laboratorio	20
4.3. Generalidades de la investigación.....	21
4.3.1. Ubicación	21
4.4. Análisis Estadístico	22
4.4.1. Diseño experimental.....	22
4.4.2 Tratamientos.....	23
4.4.3 Esquema del Análisis de Varianza	24
4.5 Manejo Especifico del Experimento	24
4.5.1 Extracción del Propóleo acuoso	24
4.5.2 Aislamiento de <i>Staphylococcus aureus</i>	25
4.6 Variable independiente.....	27
4.7 Variable dependiente.....	28
CAPITULO V	29
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	29
5.1 Prueba de Normalidad de Shapiro-Wilks y Homogeneidad de Varianza de Levene.....	29
5.2 Análisis de la Variable Ensayo 1 a las 24 horas.....	30
5.2.1 Prueba de comparación múltiple de promedios de Tukey al 5% del Ensayo 1 a las 24 horas	31
5.3 Análisis de varianza del Ensayo 2 a las 48 horas.....	33
5.3.1 Prueba de comparación múltiple de promedios de Tukey al 5% del Ensayo 2 a las 48 horas	33
5.4 Análisis del Ensayo 3 a las 72 horas	35
5.4.1 Prueba de comparación múltiple de promedios de Tukey al 5% del Ensayo 3.....	35
5.5 Análisis de varianza del Ensayo 4 a las 96 horas.....	37
5.5.1 Prueba de comparación múltiple de promedios de Tukey al 5% del Ensayo 4 a las 96 horas	38
5.6.1 Prueba de comparación múltiple de promedios de Tukey al 5% del Ensayo 5 a las 120 horas	40
CAPITULO VI.....	42
CONCLUSIONES	42
CAPITULO VII	43
CAPITULO VIII	44
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44

ANEXOS 59

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Factores de estudio	22
Tabla 2. Clasificación del CMT para Selección de Muestras.....	26
Tabla 3. Prueba de Normalidad y Homogeneidad de Varianzas.	29
Tabla 4. Análisis de varianza de la variable mediciones de halos de inhibición del Ensayo 1	30
Tabla 5. Análisis de varianza de la variable mediciones de halos de inhibición del Ensayo 2	33
Tabla 6. Análisis de varianza de la variable mediciones de halos de inhibición del Ensayo 3	35
Tabla 7. Análisis de varianza de la variable mediciones de halos de inhibición del Ensayo 4	37
Tabla 8. Análisis de varianza de la variable mediciones de halos de inhibición del Ensayo 5	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ubicación de los laboratorios en la PUCE-I.....	21
Figura 2. Prueba de comparación múltiple de promedios de Tukey al 5% de la variable	31
Figura 3. Prueba de comparación múltiple de promedios de Tukey al 5% de la variable	34
Figura 4. Prueba de comparación múltiple de promedios	36
Figura 5. Prueba de comparación múltiple de promedios de Tukey al 5% del Ensayo 4	38
Figura 6. Prueba de comparación múltiple de promedios de Tukey al 5% del Ensayo 5	40

RESUMEN

La mastitis bovina es una de las enfermedades más serias que impactan la producción de lácteos, con *Staphylococcus aureus* como uno de sus principales culpables. El presente estudio tuvo como finalidad analizar el efecto del propóleo acuoso en pruebas de laboratorio como un tratamiento alternativo contra esta bacteria, la investigación se llevó a cabo con un diseño aleatorio que incluyó cuatro tratamientos: tres diferentes concentraciones de propóleo (10, 15 y 20 mg/mL) y un grupo de control positivo que contenía cefalexina, utilizando pruebas de difusión en medio sólido para evaluar los diámetros de inhibición. Los resultados indicaron que todas las concentraciones de propóleo mostraron actividad antimicrobiana, estableciendo una relación dependiente de la dosis, sin embargo, la concentración de 20 mg/mL resultó ser la más efectiva entre los extractos analizados, aunque no superó al antibiótico comercial, el análisis de los datos reveló diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tratamientos ($p < 0.0001$), lo que demuestra la efectividad del propóleo como un agente antimicrobiano natural. Como conclusión, se establece que el propóleo acuoso tiene potencial como opción terapéutica para el tratamiento de la mastitis en vacas, ayudando a disminuir el uso de antibióticos, mitigando el riesgo de resistencia bacteriana y promoviendo prácticas de ganadería más sostenibles.

Palabras clave: Mastitis, propóleo, *Staphylococcus aureus*

ABSTRACT

Bovine mastitis is one of the most serious diseases impacting dairy production, with *Staphylococcus aureus* being one of its main culprits. This study aimed to analyze the effect of aqueous propolis in laboratory tests as an alternative treatment against this bacterium. The research was conducted using a randomized design that included four treatments: three different concentrations of propolis (10, 15, and 20 mg/mL) and a positive control group containing cephalixin. Solid medium diffusion tests were used to evaluate inhibition diameters. The results indicated that all propolis concentrations showed antimicrobial activity, establishing a dose-dependent relationship. However, the 20 mg/mL concentration proved to be the most effective among the analyzed extracts, although it did not surpass the commercial antibiotic. Data analysis revealed statistically significant differences between the various treatments ($p < 0.0001$), demonstrating the effectiveness of propolis as a natural antimicrobial agent. In conclusion, aqueous propolis has potential as a therapeutic option for treating mastitis in cows, helping to reduce antibiotic use, mitigate the risk of bacterial resistance, and promote more sustainable livestock practices.

Keywords: Mastitis, propolis, *Staphylococcus aureus*

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

La industria láctea es considerada un pilar fundamental en la agricultura mundial, pues, incorpora nutrientes esenciales, medios de subsistencia y aportaciones económicas a la sociedad, además que, en el sector alimentario tiene importancia multifacética. No obstante, su sostenibilidad está afectada por la aparición de enfermedades infecciosas que conllevan pérdidas económicas para los productores, siendo la mastitis una de ellas, ya que se considera una enfermedad significativa que perturba frecuentemente a los rebaños lecheros (Brkić y Puvača, 2024).

La industria láctea actúa como un motor económico vital, sustentando millones de medios de vida en los sectores de producción, procesamiento, distribución y venta minorista. Tanto en las economías desarrolladas como en las que están en desarrollo, la producción lechera ofrece oportunidades de empleo, generación de ingresos y desarrollo rural, contribuyendo así significativamente a la estabilidad socioeconómica (Sánchez, 2018).

Por otro lado, la mastitis se considera la enfermedad de producción más importante en la ganadería lechera, lo que provoca una considerable ineficiencia productiva con importantes consecuencias económicas, reduciendo la producción y el rendimiento y causando mortalidad, lo que resulta en grandes pérdidas anuales en la granja, lo que conlleva un aumento en los costos de los alimentos para los consumidores (Kibebew, 2017). Según Hogeveen et al., (2019) anualmente, aproximadamente entre el 20% y el 40% de las vacas lactantes experimentan uno o más casos de mastitis clínica.

Desde hace mucho tiempo, la mastitis se ha tratado a través de antibióticos, sin embargo, el uso prolongado de estos ha fomentado la resistencia antimicrobiana, un problema global que afecta tanto al bienestar animal como de las personas (Camacho, 2023).

El tratamiento convencional basado en antibióticos ha generado preocupación por el aumento de bacterias resistentes y la presencia de residuos en los productos lácteos, lo que afecta la salud pública y la confianza de los consumidores (Martínez, 2022). Además, el acceso a estos tratamientos es limitado para pequeños productores debido a barreras económicas y de capacitación, mientras que la regulación de residuos de antibióticos en productos lácteos no es estricta en el país (Pineda et al., 2024).

En este contexto, surge la necesidad de explorar soluciones más naturales como el propóleo, sustancia resinosa producida por las abejas con propiedades antimicrobianas y antiinflamatorias, ha demostrado potencial en el tratamiento de infecciones (Rodríguez et al., 2020). Dado el crecimiento de la apicultura en Ecuador, el propóleo podría convertirse en una alternativa accesible y eficaz para combatir la mastitis bovina.

Por consiguiente, la presente investigación tiene como objetivo buscar alternativas naturales que puedan reducir la dependencia de los antibióticos mediante el uso del propóleo, puesto que, al ser una sustancia de origen natural con propiedades antimicrobianas y antiinflamatorias, ofrece una solución accesible para pequeños productores ecuatorianos, quienes a menudo no tienen acceso a tratamientos como antibióticos.

Así mismo, este estudio fomenta la sinergia entre la apicultura y la ganadería, sectores claves en el desarrollo rural del país. Además de los beneficios directos para estos sectores, con el uso del propóleo como alternativa a los antibióticos se contribuye a la protección del medio ambiente (Salatino, 2022). La reducción en el uso de antibióticos ayuda a disminuir la contaminación del suelo y del agua, ya que muchos residuos farmacológicos pueden persistir en el ecosistema, afectando a la flora y fauna locales.

CAPITULO II

OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Evaluar el efecto del propóleo in vitro de la mastitis bovina en cultivos de la bacteria *Staphylococcus aureus*.

2.2. Objetivos Específicos:

- Caracterizar la actividad antimicrobiana del propóleo frente a los principales patógenos causantes de mastitis bovina, mediante pruebas in vitro, para identificar su potencial como agente terapéutico alternativo.
- Identificar la concentración de propóleo más eficiente en el crecimiento de la bacteria *Staphylococcus aureus* en cultivos in vitro.

2.3. Hipótesis

- **Hipótesis nula (H₀):** No existen diferencias significativas en la inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus* entre los tratamientos evaluados en cultivos in vitro.
- **Hipótesis alterna (H_a):** Existen diferencias significativas en la inhibición del crecimiento de *Staphylococcus aureus* entre los tratamientos evaluados en cultivos in vitro.

CAPITULO III

ESTADO DEL ARTE

3.1 *Staphylococcus aureus* como Principal Agente Etiológico

Las bacterias responsables de la mastitis se encuentran en diversos entornos, por lo que varían en sus métodos de propagación, infección y manejo, el *Staphylococcus aureus* y el *Streptococcus agalactiae* están principalmente vinculados a ubres afectadas, daños en los pezones y la colonización del canal del pezón, propagándose de una vaca a otra y de un cuarto a otro durante el ordeño o poco después. Los patógenos ambientales (coliformes, *Streptococcus uberis* y *Pseudomona aeruginosa*) son comunes en los hábitats de los animales, especialmente en condiciones húmedas (barro) y/o con gran cantidad de materia orgánica (excrementos, sobras de comida como forrajes o granos húmedos, etc.) (Galli et al., 2019)

En particular, *S. aureus* se ha consolidado como uno de los principales agentes etiológicos de la mastitis crónica, dado que posee múltiples mecanismos que favorecen la adherencia al epitelio mamario, la formación de biopelículas y la evasión del sistema inmunitario. Estas características le permiten persistir en el hospedero, generar infecciones recurrentes y mostrar menor respuesta a los tratamientos convencionales. Su capacidad para establecer infecciones subclínicas prolongadas convierte a las vacas infectadas en reservorio dentro de los hatos, favoreciendo la transmisión silenciosa durante ordeños consecutivos (Abdellaoui et al., 2020).

Los patógenos ambientales como los coliformes *Streptococcus uberis* y *Pseudomona aeruginosa* se encuentran habitualmente en el entorno de los animales, especialmente en condiciones húmedas y en materiales con alta carga orgánica, como barro, excremento etc.

Adicionalmente, investigaciones recientes han demostrado que la interacción entre los patógenos contagiosos y el ambiente puede potenciar el riesgo de infección. Factores como la humedad excesiva, la mala ventilación, el estrés térmico o la sobre carga bacteriana en la cama incrementan la susceptibilidad de la glándula mamaria y facilita la instalación de microorganismos oportunistas. En este contexto, *S. aureus* representa un desafío particular, ya que su persistencia en el hato y su capacidad de adaptación contribuyen al mantenimiento de ciclos de infección incluso cuando se controlan adecuadamente los patógenos ambientales (Aiemsard et al., 2011).

3.1.1 *Staphylococcus aureus* Participación en Casos Clínicos y Subclínicos

Diversos estudios señalan que *S. aureus* es uno de los agentes más frecuentes en la mastitis clínica, registrando prevalencias que van aproximadamente del 42.9% al 74%. Estas variaciones dependen del tipo de manejo, las condiciones ambientales y las técnicas utilizadas para el diagnóstico (Villalobos, 2017). Además, esta bacteria no solo se transmite con facilidad durante el ordeño, sino que también posee múltiples genes de virulencia que aumentan su capacidad de causar daño. Entre lo más reportado se encuentran hla (hemolisina alfa), presente entre el 49.09% y el 100% de los aislados; hbl (hemolisina beta), detectado en un 60% a 84.9%; y blaZ (beta-lactamasa), identificado en el 92.73% de las cepas. Estos genes le permiten adherirse, invadir y deteriorar el tejido mamario lo que complica su control y eliminación (Asanza et al., 2024).

La presencia de cepas de *S. aureus* con resistencia antimicrobiana resulta especialmente preocupante. Estudios recientes reportan que hasta el 64% de los aislados presentan perfiles de multirresistencia, y más del 20% portan el gen *mecA*, responsable de codificar la proteína PBP, la cual confiere resistencias a los antibióticos beta-lactámicos, incluida la meticilina y otros antimicrobianos de amplio espectro. Esto representa un riesgo

significativo tanto para la sanidad animal como para la salud pública, ya que las cepas que poseen este gen suelen mostrar opciones terapéuticas más limitadas y una mayor capacidad de persistencia en el hospedero (Vélez et al., 2019).

En los casos de mastitis, el *Staphylococcus aureus* ocasiona una inflamación visible en la ubre, la cual se manifiesta con enrojecimiento, calor, dolor y cambios en la leche, tales como grumos o variaciones en el color, dichas infecciones suelen ser severas y dolorosas; aunque pueden responder en parte al tratamiento, es probable que haya episodios de recaídas, la gravedad de la infección está relacionada con la virulencia de la cepa y la condición inmunológica del animal (Gussmann et al., 2019).

En las formas subclínicas, el agente permanece en el tejido mamario sin provocar signos aparentes, pero se observa un aumento en el conteo de células somáticas en la leche, son las más complicadas de identificar, y su relevancia radica en que constituyen una fuente constante de contagio dentro del rebaño, la leche de vacas afectadas por mastitis subclínica puede no mostrar cambios evidentes, pero su calidad es inferior y puede influir en la producción de productos lácteos (Sachuk et al., 2019).

Varios estudios han evidenciado que *S. aureus* es responsable de una parte considerable de los casos de mastitis subclínica en comparación con otros patógenos, su capacidad de adaptarse al entorno mamario y eludir la respuesta inmune del huésped le permiten durar un periodo prolongado (Kumari et al., 2020). Por lo tanto, es fundamental realizar monitoreos regulares a través de pruebas diagnósticas como el CMT o el cultivo bacteriológico para detectar estos casos silenciosos y gestionar la propagación del agente (De Olives et al., 2020).

3.1.2 Mecanismos de Patogenicidad y Persistencia en la Glándula Mamaria

La capacidad patógena de *S. aureus* se fundamenta en una diversidad de elementos que le permiten adherirse, penetrar y mantenerse en el interior de la glándula mamaria, entre estos elementos están las proteínas que facilitan su adhesión a las células epiteliales del tejido mamario, así como la producción de toxinas que dañan estas células y provocan una respuesta inflamatoria, estos mecanismos no solo causan daño en los tejidos, sino que también complican la eliminación del microorganismo por parte del sistema inmunológico del hospedador (Michael et al., 2023).

Diversos estudios señalan que *S. aureus* continúan siendo uno de los agentes más relevantes en la mastitis contagiosa aportando de un 20% al 40% de los casos en sistemas lecheros. Su impacto se relaciona con la capacidad del microorganismo para establecerse de manera eficiente en la glándula mamaria y generar infecciones de curso prolongado (Barkema et al., 2006). El proceso infeccioso suele iniciar cuando la bacteria accede al canal del pezón y se adhiere a las células epiteliales, aprovechando microlesiones presentes en el tejido. Esta adherencia está mediada por proteínas de superficie especializadas, entre las que se destacan aquellas con afinidad por fibronectina y fibrinógeno, como FnbA y ClfA que favorecen la colonización inicial y facilitan el establecimiento del patógeno en el hospedero (Balouiri et al., 2016).

Diversas investigaciones han demostrado que una proporción considerable de los aislamientos de *S. aureus* asociados a mastitis bovina presentan genes que favorecen la adhesión y la colonización, entre ellos *fnbA* y *clfA*, los cuales se han identificado en alrededor del 70% de las cepas estudiadas (Bedruddin, 2023). La expresión de estas proteínas facilita la instauración de infecciones persistentes y promueve la formación de biofilms, estructuras que se desarrollan en las primeras 48-72 horas y que reducen de manera

significativa la acción de las antimicrobianas, con disminuciones de eficacia que pueden alcanzar entre el 60 y 80% (Brito et al., 2024).

La capacidad de formar biofilm constituye uno de los mecanismos de patogenicidad más determinantes, pues crea un microambiente que restringe tanto la penetración del antibiótico como la respuesta inmunitaria del hospedero (Bujňáková y Karahutová, 2024). Bajo estas condiciones, la efectividad de un antibiótico como la penicilina puede disminuir entre un 50% y un 70%, favoreciendo que cerca del 25-35% de los cuadros clínicos evolucionen hacia procesos crónicos (Dario, 2024)

Otro factor relevante es la presencia de proteínas A (SpA), cuya interacción con inmunoglobulinas IgG inhibe la opsonización y reduce la fagocitosis por parte de los neutrófilos. Se ha reportado que esta interferencia inmunitaria puede alcanzar niveles cercanos al 45%, y que su regulación durante infecciones prolongadas contribuye aún más a la evasión inmunológica (Chakraborty, 2019). Adicionalmente, la producción de toxinas como la α -hemolisina (Hla) promueve apoptosis en células epiteliales y neutrófilos, facilitando la internalización del patógeno en comportamientos intracelulares donde puede persistir por periodos prolongados (Espinoza y Mier, 2013).

La capacidad de invasión intracelular, observada en hasta el 40% de los aislados clínicos, se relaciona directamente con la recurrencia pos tratamiento, alcanzando tasas cercanas al 30% debido a la limitada penetración de antibióticos en estos nichos (Avellan et al., 2019). Asimismo, la presencia de enterotoxinas termoestables (SEA-SEE), identificadas en alrededor del 20% de las cepas, contribuye al daño tisular y representa un riesgo para la inocuidad alimentaria, ya que pueden resistir procesos térmicos como la pasteurización (Bujňáková y Karahutová, 2024).

La progresión hacia cuadros crónicos se asocia con cambios estructurales en el tejido mamario; por ejemplo, se ha documentado que entre el 60% de los alveolos afectados

desarrollan fibrosis tras 4-6 semanas, generando atrofia irreversible y reducciones en la producción láctea que oscilan entre el 25% y el 45% (Foster et al., 2014). A esto se suman factores extrínsecos como el estrés calórico, que puede aumentar la susceptibilidad a la infección en un 20% al comprometer la función de neutrófilos, y prácticas inadecuadas de ordeño, que elevan la incidencia de nuevos casos hasta un 35% (Gonçalves, 2018).

El manejo terapéutico también influye de manera determinante. Tratamientos antimicrobianos incompletos, especialmente aquellos menos de cinco días, sean asociados con tasas de recaída cercana al 40% (Bedruddin, 2023).

A nivel molecular, aproximadamente el 75% de las cepas bovinas portan el gen *aur*, responsables de codificar la aureolisina, una proteasa que facilita la invasión y el daño tisular (Espinoza y Mier, 2013).

La presencia de cepas resistentes a meticilina (MRSA), en particular del linaje CC398, ha sido reportada en proporciones del 10-20% en distintos países europeos, mostrando resistencia a β -lactámicos y tetraciclinas y complicando significativamente el manejo clínico. Frente a este panorama, estrategias innovadoras como vacunas multivalentes dirigidas a antígenos como ClfA y Hla han mostrado reducciones de hasta el 50% en la persistencia bacteriana en estudios de campo, lo que abre una vía prometedora para mejorar el control de la mastitis bovina (Jafari, 2019).

Un aspecto crucial para la persistencia de *S. aureus* es su habilidad para formar biopelículas, estas estructuras compuestas por múltiples células funcionan como una barrera que disminuye la eficacia de los antibióticos y desinfectantes, lo que permite a las bacterias sobrevivir tanto en el ambiente como dentro de los conductos mamarios. Asimismo, algunas cepas pueden infiltrarse en las células epiteliales, donde se mantienen a resguardo del sistema inmunológico y de los tratamientos antimicrobianos (Michael et al., 2023).

La capacidad de *S. aureus* para ajustarse y resistir las defensas del huésped transforma la mastitis provocada por este agente patógeno en un problema crónico que resulta complicado de manejar, su presencia en el rebaño no solo logra perpetuar las pérdidas en producción, sino que también plantea un reto constante para los programas de control sanitario, por esta razón, es fundamental entender sus mecanismos patogénicos para desarrollar enfoques más eficientes en prevención y tratamiento (Michael et al., 2023).

3.1.3 Desafíos por Resistencia Antimicrobiana en *S. aureus*

La resistencia a los antimicrobianos en *Staphylococcus aureus* constituye uno de los mayores obstáculos en el manejo de la mastitis en vacas, la utilización excesiva o incorrecta de antibióticos en la industria láctea ha facilitado la aparición de cepas resistentes, entre las cuales se encuentran las llamadas MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente a meticilina), estas variantes son particularmente complicadas, ya que no solo son difíciles de tratar, sino que también conllevan un riesgo potencial para la salud pública debido a su capacidad de transmitirse a través de los animales (Bitrus et al., 2018).

Las cepas resistentes poseen mecanismos a nivel molecular que destruyen los efectos de los antibióticos o evitan su acción sobre las bacterias, entre estos mecanismos se encuentran la modificación de los puntos de acción del fármaco, la generación de enzimas como las β -lactamasas y la creación de biopelículas que obstaculizan la entrada de los medicamentos, disminuyendo de manera considerable la efectividad de los tratamientos tradicionales y obliga a la búsqueda de opciones terapéuticas más viables (Church y McKillip, 2021).

Uno de los hallazgos más relevantes en la investigación sobre *S. aureus* bovino resistente a los antibióticos, en el contexto de la mastitis, es la identificación de cepas con resistencia simultánea a varios grupos de antimicrobianos. Estas cepas, catalogadas como

multirresistentes, presentan resistencia al menos a tres tipos de antibióticos, lo que reduce de manera considerable las alternativas terapéuticas disponibles (Islam et al., 2025). Estudios también han reportado la presencia de cepas con MDR (Multidrug-Resistant) y múltiples regiones del mundo, lo que evidencia que se trata de un problema de alcance global y resalta la necesidad de adoptar estrategias responsables de uso y manejo de antimicrobianos (Bujňáková y Karahutová, 2024).

Ante esta situación, es fundamental adoptar un enfoque racional en el uso de antibióticos y desarrollar programas de vigilancia de la resistencia bacteriana en las explotaciones lecheras, la exploración de tratamientos alternativos, como productos naturales con propiedades antimicrobianas, surge como una opción prometedora para manejar las infecciones por *S. aureus* sin contribuir a la resistencia (Church y McKillip, 2021).

3.2 Alternativas naturales a los antibióticos convencionales en el tratamiento de la mastitis bovina

El creciente interés por alternativas terapéuticas no convencionales en el tratamiento de la mastitis bovina se ha intensificado debido a las preocupaciones globales relacionadas con la resistencia antimicrobiana y la presencia de residuos de antibióticos en la leche. En este contexto, diversas líneas de investigación han explorado opciones de origen natural que puedan ofrecer tratamientos eficaces, sostenibles e inocuos, reduciendo la dependencia de los antimicrobianos tradicionales. Entre estas alternativas destacan el uso de extractos de plantas medicinales, probióticos, bacteriófagos y otros compuestos de origen biológico, los cuales representan áreas emergentes con resultados prometedores (Islam, 2025).

Dentro de las propuestas de origen vegetal, las plantas medicinales con actividades antimicrobianas y antiinflamatorias han recibido particular atención. Diversas especies han

mostrado eficacia tanto *in vitro* como *in vivo* frente a patógenos claves involucrados en la mastitis bovina, incluyendo *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus uberis*. Los compuestos bioactivos presentes en estas plantas pueden actuar mediante mecanismos novedosos, lo que podría contribuir a superar algunos de los retos asociados a la resistencia bacteriana (Benbassat, 2025).

Otra estrategia de interés es el uso de probióticos, microorganismos benéficos capaces de modular el microbiota local de la glándula mamaria. Su incorporación puede favorecer el equilibrio microbiano, estimular la inmunidad local y competir directamente con los patógenos, lo que se traduce en una reducción del riesgo de infección y una menor severidad de los cuadros clínicos. Ensayos recientes han demostrado mejoras en la incidencia y evolución de las mastitis tras la administración de cepas probióticas específicas (Gobierno de México, 2019).

Los bacteriófagos representan igualmente una alternativa natural innovadora. Estos virus, altamente específicos, infectan y destruyen únicamente a determinadas bacterias, lo que permite atacar a los agentes etiológicos sin afectar al microbiota benéfico. La llamada “terapia de fagos” ha mostrado eficacia frente a cepas de *S. aureus* y otros microorganismos comúnmente asociados a la mastitis, convirtiéndose en una herramienta potencial para enfrentarse infecciones persistentes o resistentes a antibióticos (Islam, 2025).

Adicionalmente, los péptidos antimicrobianos (PAM) constituyen un componente central de la inmunidad innata en los bovinos y han demostrado una actividad significativa frente a *S. aureus*, incluyendo cepas resistentes a múltiples fármacos. Su eficacia se debe tanto a su capacidad de desestabilizar la membrana bacteriana, provocando lisis celular, como a su acción sobre procesos intracelulares esenciales, lo que dificulta la aparición de resistencia bacteriana (Criscuolo, 2019). En bovinos, péptidos como la β -defensinas, las catelicidinas BMAP y la lactoferricina presentan actividad comprobada contra *S. aureus* y

pueden inhibir la formación de biopelículas, uno de los principales mecanismos que favorecen la persistencia de la mastitis crónica (Huan, 2020). Además, se ha observado que ciertos compuestos naturales, como los presentes en el propóleo, pueden potenciar la acción de los PAM al modular la respuesta inmune local y favorece la destrucción bacteriana, lo que los convierte en estrategias complementarias prometedoras para el manejo de mastitis sin antibióticos (Bankova, 2024).

3.3 Características del propóleo

El propóleo es una resina de tonalidad oscura que muchos describen como un rojo profundo con matices verdosos. Su sabor es muy particular, generalmente considerado agrio y ligeramente picante. Por esta razón, suele consumirse en forma líquida, disuelto en alcohol.

Su textura es difícil de definir, ya que cambia según la temperatura: en general se lo considera una masa sólida en algo pegajosa. Guerrero (2015) señala que sus características físicas pueden variar según la región donde se produce. Sin embargo, de manera más general, puede describirse como una masa flexible que, al congelarse se vuelve muy dura (Carvajal,2016).

3.3.1 Utilidad del propóleo en animales

El propóleo es un compuesto natural producido por las abejas a partir de resinas vegetales. Sus componentes como flavonoides, terpenos y ácidos fenólicos le otorgan propiedades que pueden ser aprovechadas en la ganadería bovina; este actúa como un estimulando natural de las defensas. En vacas, esto puede ayudar a reducir la incidencia de enfermedades comunes, especialmente en etapas críticas como la transición, el posparto o en terneros durante las primeras semanas (Bankova, 2024).

Extractos etanólicos de propóleo han mostrado ser bactericidas contra cepas de *S. aureus* aisladas de vacas con mastitis. En un estudio in vitro, una concentración de 1mg/mL de EEP fue capaz de eliminar por completo poblaciones de *S. aureus* de hasta 10^7 UFC/mL.

Este mismo estudio observó que cuando las bacterias estaban en la leche (en lugar de medios de cultivo), la dosis bactericida era mayor, lo que sugiere que los componentes de la leche interfieren con la actividad del propóleo (Abdellaoui et al., 2020).

3.3.2 Potencial Terapéutico del Propóleo Acuoso

Es un material creado por las abejas *Apis mellifera* a partir de resinas y sustancias vegetales con una textura pegajosa, para obtener el propóleo como resultado final, las abejas mezclan sus secreciones salivales, cera y polen, prefieren recoger las resinas durante las horas más cálidas del día, ya que son más suaves y fáciles de manejar, las obtienen raspando con su mandíbula y utilizando sus patas para moldearlas en pequeñas bolas que colocan en sus corbículas, este material se usa como un antibiótico natural, ayudando a defenderse contra bacterias, virus y hongos, además de mantener la colmena limpia (Vásquez et al., 2012).

El extracto acuoso de propóleo retiene una fracción significativa de compuesto hidrosolubles, entre ellos flavonoides, ácidos fenólicos y antioxidantes naturales, los cuales conferirían propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias, inmunomoduladores y cicatrizantes (Bedruddin, 2023).

3.3.3 Composición Química y Propiedades Biológicas del Propóleo

La composición química del propóleo varía dependiendo de la flora local de donde las abejas recolectan las resinas. Sin embargo, en términos generales, se compone de flavonoides, ácidos fenólicos, terpenos, aceites esenciales, y ésteres, que son los responsables de sus propiedades biológicas (Rodríguez et al., 2020).

Los flavonoides, en particular, son conocidos por su potente actividad antimicrobiana y antioxidante, inhibiendo el crecimiento de bacterias y protegiendo los tejidos contra el daño oxidativo (Woźniak et al., 2023).

Los ácidos fenólicos son compuestos solubles en agua que se encuentran en el propóleo y que tienen gran relevancia por sus efectos beneficiosos. Entre los más conocidos están el ácido cafeico, el ácido ferúlico y el ácido p-cumárico. Estas moléculas muestran propiedades antioxidantes, antivirales y antiinflamatorias (Dario, 2024). Según estudios, pueden neutralizar radicales libres y disminuir los daños celulares causados por el estrés oxidativo.

Los taninos son polifenoles de alto peso molecular con efectos astringentes, antimicrobianos y antioxidantes. Por otro lado, los polisacáridos bioactivos presentes en el propóleo están relacionados con la estimulación del sistema inmunológico, promoviendo la actividad y proliferación de macrófagos y linfocitos. La combinación de taninos y polisacáridos ayuda a proteger al organismo frente a agentes patógenos y a regular procesos inflamatorios (Villalobos, 2017).

El propóleo también contiene aminoácidos esenciales y no esenciales, junto con otros antioxidantes menores. Estas sustancias participan en la defensa de las células contra los radicales libres, aumentando el valor nutricional del propóleo y reforzando su capacidad de proteger frente al estrés oxidativo y al envejecimiento.

Esta investigación, además, sugiere que en diferentes regiones han demostrado que el propóleo tiene un amplio espectro de acción antimicrobiana, capaz de combatir bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, así como hongos y algunos virus, esto lo convierte en una alternativa viable al uso de antibióticos en animales de producción, especialmente en infecciones como la mastitis bovina (Woźniak et al., 2023).

Según Sforcin, (2016) el propóleo ha demostrado una alta eficacia contra varios de los patógenos más comunes que causan mastitis, como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Streptococcus agalactiae*. Recientes estudios mostraron que el extracto de propóleo

inhibe el crecimiento de estos microorganismos, reduciendo significativamente la carga bacteriana en las glándulas mamarias afectadas por la mastitis (Stojanović et al., 2020).

Esta capacidad para combatir las infecciones bacterianas sin inducir resistencia antimicrobiana es uno de los aspectos más atractivos del propóleo (Sforcin, 2016). Además de su actividad antibacteriana, el propóleo también tiene propiedades antiinflamatorias, que pueden ayudar a reducir la inflamación asociada a la mastitis, su acción en el sistema inmunológico ha sido estudiada, demostrando que puede modular la respuesta inmune, lo que podría ser beneficioso en la prevención de recaídas o infecciones recurrentes en el ganado lechero (Woźniak et al., 2023).

En la medicina veterinaria, el uso del propóleo ha sido estudiado como tratamiento para diversas enfermedades infecciosas en animales de producción, se ha utilizado en infecciones de la piel, enfermedades respiratorias y, en los últimos años, se ha explorado su uso en la salud mamaria de las vacas lechera, el estudio sugiere que el propóleo podría reducir el uso de antibióticos en el manejo de la mastitis, disminuyendo así la incidencia de residuos de medicamentos en la leche y mitigando el problema de la resistencia antimicrobiana (Sforcin, 2016).

En Ecuador, el propóleo tiene un gran potencial de aplicación en la ganadería debido al crecimiento de la apicultura y la disponibilidad de esta sustancia, su uso en el tratamiento de la mastitis podría no solo mejorar la calidad de la leche, sino también generar una mayor sinergia entre la apicultura y la ganadería, dos sectores importantes para la economía rural del país (Rodríguez et al., 2020).

3.3.4 Mecanismo de Acción del Propóleo Sobre Bacterias Gram Positivas

Las bacterias Gram positivas, por ejemplo, *Staphylococcus aureus*, tienen una pared celular que es gruesa y está formada en su mayor parte de peptidoglucano; esta es el objetivo

principal de los compuestos antimicrobianos naturales, el propóleo lleva a cabo su efecto antibacteriano por medio de varios mecanismos sinérgicos, lo cual disminuye la posibilidad de que surja resistencia bacteriana (Campos et al., 2020).

La modificación de la integridad de la membrana citoplasmática, que se produce cuando los compuestos fenólicos interactúan con los lípidos de la membrana, provocando pérdida del potencial eléctrico y fuga de iones, es uno de los procesos más relevantes. Asimismo, la galangina y la pinocembrina, que son flavonoides, bloquean las enzimas necesarias para la replicación de las bacterias, como la RNA polimerasa y la DNA girasa. Esto imposibilita que se produzcan ácidos nucleicos (Gebara et al., 2002).

El propóleo, además, causa deterioro oxidativo en las bacterias por medio de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que conlleva a la desnaturalización de proteínas y a la peroxidación lipídica, la inhibición del crecimiento bacteriano o la muerte celular son el resultado de estos efectos, lo cual evidencia que el propóleo ejerce como un poderoso y multifuncional agente antimicrobiano contra las bacterias Gram positivas (Bankova, 2024).

3.4 Estudios In Vitro del Propóleo Frente a *Staphylococcus aureus*

El propóleo ha probado ser efectivo contra *Staphylococcus aureus*, una bacteria dañina que causa varias infecciones en la piel, el sistema respiratorio y el sistema digestivo, según varios estudios in vitro. Las investigaciones de Bouchelaghem et al., (2018) mostraron que los extractos acuosos de propóleo disminuyen considerablemente el crecimiento de cepas de *S. aureus*, lo cual se demuestra con la reducción del diámetro en la zona de inhibición cuando se hacen pruebas de difusión en agar.

Además, investigaciones de de Sá Assis et al., (2022) revelaron que el propóleo acuoso disminuye la creación de biopelículas bacterianas, algo importante porque las

biopelículas son una forma de resistencia a los agentes antimicrobianos convencionales, los hallazgos señalaron que los componentes fenólicos del extracto obstaculizan la producción de polisacáridos extracelulares, los cuales son fundamentales para la estructura de la biopelícula (Benbassat, 2025).

El propóleo acuoso tiene la capacidad de aumentar el efecto de antibióticos convencionales, lo que es otro hallazgo importante, se logra a través de una acción sinérgica que posibilita disminuir las dosis necesarias, esto indica que el propóleo podría utilizarse como un coadyuvante terapéutico para tratar infecciones por *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA), lo cual sería una opción natural y esperanzadora ante el problema en aumento de la resistencia bacteriana (Bouchelaghem, 2022).

3.5 Función del etanol en el propóleo

El propóleo está formado por una mezcla compleja de resinas, ceras y sustancias fenólicas que, por su estructura química, no se disuelven bien en agua. Esto ocurre especialmente con los flavonoides y los ácidos fenólicos, que son los principales responsables de sus efectos biológicos. Varios autores coinciden en que el etanol es el solvente más eficaz para liberar estos componentes, gracias a su polaridad intermedia y a su capacidad para atravesar la matriz resinosa del propóleo (Bankova, 2024).

Asimismo, se ha documentado que el uso de etanol no solo incrementa el rendimiento de compuestos bioactivos, sino que también favorece su biodisponibilidad. Cuando el propóleo se formula como extracto hidroalcohólico, el organismo puede absorber con mayor facilidad sustancias como el ácido cafeico, la pinocembrina, la quercetina o el artepilín C, dependiendo del origen botánico. Según Sforcin y Bankova, (2011) la extracción hidroalcohólica produce un extracto más estable y más rico en flavonoides, lo que se traduce en una mayor actividad antioxidante, antimicrobiana y

antiinflamatoria. En consecuencia, el etanol potencia las propiedades terapéuticas del propóleo al liberar y preservar de manera más eficaz los compuestos responsables de su actividad biológica.

De acuerdo con García et al., (2013) , los extractos etanólicos mantienen la estabilidad de los compuestos activos durante periodos prolongados, aspecto crucial para aplicaciones medicinales o de investigación. Esta estabilidad también permite dosificaciones precisas en presentaciones líquidas como gotas o sprays, resultando más práctico que trabajar con propóleo crudo o en forma resinosa.

3.6 Ventajas del Uso de Propóleo Acuoso Frente a Otras Formas de Presentación

El propóleo se puede presentar en varias formas de extracción; entre las más frecuentes están el extracto acuoso y el extracto etanólico, no obstante, el empleo del propóleo acuoso brinda beneficios importantes, en particular en las aplicaciones médicas y farmacológicas (Isidorov et al., 2022). Desde el enfoque farmacotécnico, el propóleo acuoso tiene una biocompatibilidad más alta y una citotoxicidad más baja, lo que hace posible que se pueda incluir en productos como soluciones oftálmicas, colutorios, ungüentos y cremas (Bhargava et al., 2021).

CAPITULO IV

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Materiales e insumos

- Balanza analítica de laboratorio ADAM
- Autoclave N_BIOTECK
- Incubadora N_BIOTECK
- McFarland Densitómetro - BIOSAN

4.2. Reactivos

- Mannitol Salt Agar BBL
- Mannitol Salt Broth TMMedia
- Cefalexina
- Mueller Hinton Agar – MHA TMMedia

4.2.1 Material Biológico

- Propóleo
- Cepas de *Staphylococcus aureus*

4.2.2 Materiales de Laboratorio

- Puntas azules
- Puntas amarillas
- Hisopos de madera de 10 cm
- Cajas Petri
- Tubos de ensayo de 10 mL
- Mecheros

- Micropipeta de 10 μ l – 100 μ l
- Frascos Boeco de 1000 mL

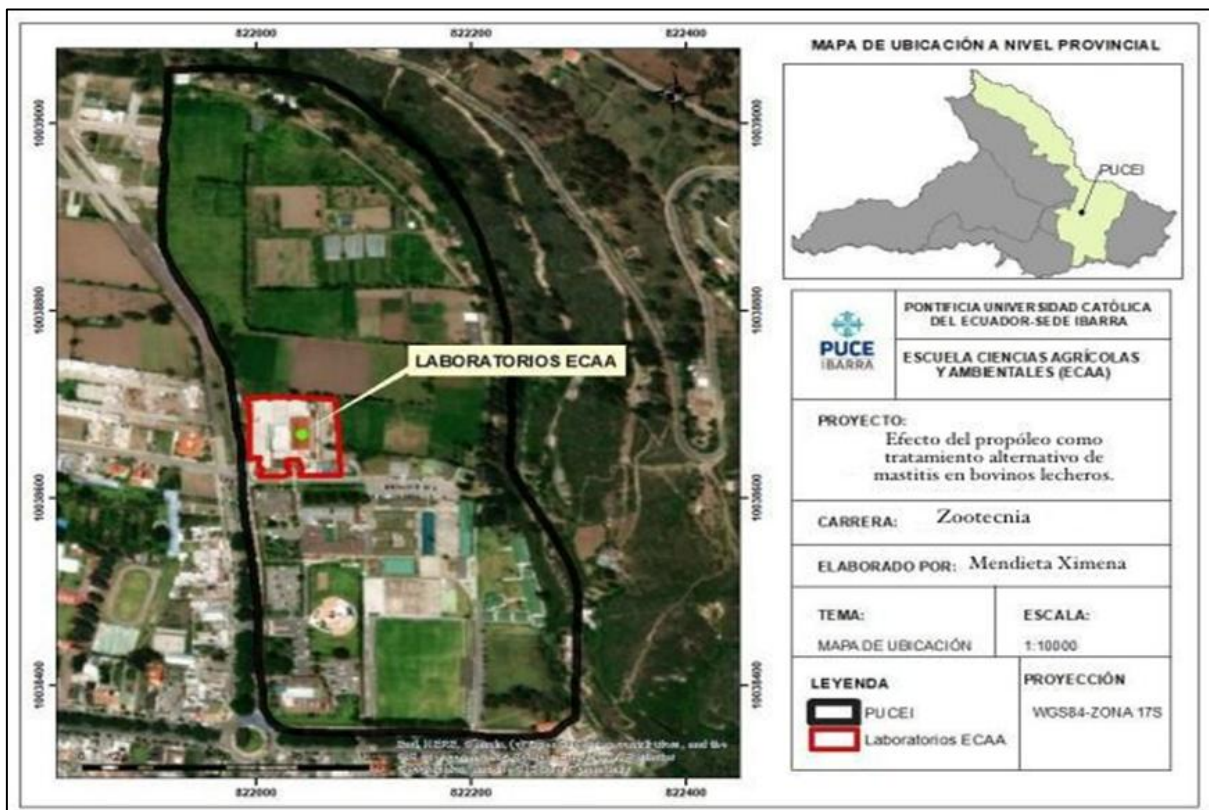
4.3. Generalidades de la investigación

4.3.1. Ubicación

El experimento se realizó en la provincia de Imbabura en la ciudad de Ibarra, Ecuador, en los laboratorios de microbiología y biotecnología en la Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Escuela de Ciencias Agropecuarias y Ambientales sede Ibarra. Esta se encuentra a una Latitud de 0° 21' 10.8" N y una Longitud: 78° 06' 41.8" W , a una altitud de 2200 metros sobre el nivel del mar (m.s.n.m)

Figura 1.

Ubicación geográfica de los laboratorios en la PUCE-I



Nota. El grafico representa la ubicación de la sede universitaria donde se realizo el ensayo, este grafico se obtuvo do por medio de ArcGIS.

4.4. Análisis Estadístico

4.4.1. Diseño experimental

Se utilizó un diseño completamente al azar (DCA), en el cual se aplicaron 4 tratamientos con 5 repeticiones, eso nos da un total de 20 unidades experimentales. Cada unidad experimental tuvo 5 tomas de muestras, teniendo así 100 muestras para toda la investigación, los 4 tratamientos presentaron un nivel de inclusión del propóleo y el testigo el cual fue cefalexina pura antibiótico comercial, por lo tanto, la investigación queda de la siguiente forma:

- **Diseño experimental:** Diseño completamente al azar (DCA)
- **Numero de tratamientos:** 4
- **Repeticiones por tratamientos:** 5
- **Unidades experimentales totales:** 20
- **Muestras por unidad experimental:** 5
- **Muestras totales:** 100

Este diseño fue seleccionado según la investigación realizada por Balourl et al., ya que es ampliamente utilizado en ensayos in vitro de actividad antimicrobiana, ya que controla la variabilidad inherente de las muestras biológicas y facilitar el análisis estadístico de los datos mediante ANOVA (Balourl, Sadiki, & Ibnsouda, 2016).

El procesamiento estadístico se realizó mediante el software XLSTAT (versión 2023.2.0;1411; ID de licencia: b1672737- bf0f-472b-a655-46d8039fd975) para realizar el ANOVA, asegurando resultados eficientes y exactos de los datos.

4.4.2 Tratamientos

Los tratamientos descritos en la Tabla 1 fueron los aplicados para el desarrollo de este estudio, este se realizó aplicando diferentes concentraciones de propóleo junto con un control positivo (Cefalexina). Cefalexina es un antibiótico con un único principio activo cefalexina mono hidrato, este es un antibiótico β -lactámico perteneciente a las cefalosporinas de 1° generación, caracterizado por su acción bactericida al interferir con la síntesis de la pared celular bacteriana (Rossi A. L., 2019). Este antibiótico fue seleccionado como control positivo por su gran eficacia en eliminar bacterias Gram positivas asociadas a mastitis bovina destacando: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis* (Bankova, 2024).

Los extractos de propóleo se evaluaron en las siguientes concentraciones 10 mg/ml propóleo acuoso; 15 mg/ml propóleo acuoso; 20 mg/ml propóleo acuoso. Concentraciones similares han sido empleadas en investigaciones con propóleo, respaldando su eficacia para la inhibición de la bacteria *S. aureus* (Ali, 2015).

Tabla 1.

Factores de estudio

TRATAMIENTO	DESCRIPCIÓN
T1	10 mg/ml propóleo acuoso
T2	15 mg/ml propóleo acuoso
T3	20 mg/ml propóleo acuoso
T4	1 mg/ml Cefalexina pura

4.4.3 Esquema del Análisis de Varianza

A continuación, se muestra el análisis de varianza (ANOVA) aplicado para determinar diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos evaluados.

Esquema Análisis de Varianza	
Fuente de variación	Grados de libertad (gl)
Tratamientos	3
Error experimental	16
Total	19

4.4.3.1 Análisis Funcional

- Prueba de normalidad Shapiro Wilks
- Coeficiente de variación
- Comparación múltiple de medias de Tukey al 5%

4.5 Manejo Especifico del Experimento

4.5.1 Extracción del Propóleo acuoso

Para asegurar la eficiencia del proceso, el propóleo crudo fue previamente sometido a congelación durante una hora, con el fin de facilitar su fragmentación y aumentar la superficie de contacto con el solvente, tal como recomiendan estudios clásicos de extracción botánica (Bankova, 2024). Posteriormente, el material congelado se trituró manualmente hasta obtener partículas pequeñas.

Para la extracción se utilizó etanol, debido a que este solvente posee alta capacidad de solubilización de flavonoides, compuestos fenólicos y resinas bioactivas presentes en el propóleo (García, 2013). La relación sólido-líquido empleada fue de 1:10 (mg/mL), una proporción reconocida como óptima para maximizar la eficiencia extractiva en matrices resinosas (Huan, 2020). El propóleo triturado se colocó en frascos de vidrio ámbar

previamente esterilizados, y se adicionó el volumen correspondiente de etanol al 70 %, debido a que esta concentración favorece la extracción de compuestos polares y semipolares sin arrastrar excesivas ceras (Sforcin y Bankova, 2011).

La mezcla se mantuvo en maceración durante 2 días a temperatura ambiente, protegida de la luz, con agitación manual diaria para favorecer la transferencia de masa entre la fase sólida y el solvente. La maceración prolongada permite una difusión gradual de los compuestos bioactivos hacia el medio etanólico, proceso ampliamente descrito en estudios de extracción de productos naturales (Rossi et al., 2019). Finalizado el tiempo de maceración, el extracto fue filtrado mediante papel de filtro para eliminar partículas de cera, residuos sólidos y otras impurezas insolubles.

El solvente etanólico fue eliminado mediante calentamiento en baño María controlado a una temperatura máxima de 50 °C, a fin de evitar la degradación de flavonoides sensibles al calor (Huan, 2020). El concentrado resultante se diluyó con agua destilada hasta alcanzar el volumen final deseado, obteniéndose así un extracto acuoso apto para el ensayo, particularmente para pruebas de actividad antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus*, microorganismo frente al cual el propóleo ha demostrado eficacia significativa (Barkema et al., 2018).

4.5.2 Aislamiento de *Staphylococcus aureus*

4.5.2.1 Recolección de Muestras de Leche

Se realizó bajo condiciones estériles para preservar la integridad de las muestras y minimizar la contaminación. Las vacas seleccionadas fueron examinadas previamente para verificar la presencia de signos clínicos o subclínicos de mastitis, como inflamación en la ubre, alteraciones en la composición de la leche o una reducción en la producción (Cheng & Han, 2020).

Como método de diagnóstico preliminar se utilizó la prueba CMT, debido a su capacidad para identificar de forma rápida la incidencia de esta enfermedad en el ganado bovino (Rossi et al., 2018). Para cada muestra se combinaron volúmenes iguales de 2 mL de leche provenientes de cada cuarto mamario con el reactivo CMT en una paleta de cuatro divisiones diseñada para esta prueba. La mezcla se agitó suavemente durante 10 segundos y la reacción fue evaluada visualmente dentro de los siguientes 30 segundos (Jamali et al., 2018).

La clasificación se realizó conforme a los parámetros planteados en la tabla 2

Tabla 2.

Clasificación del CMT para Selección de Muestras.

<i>Resultado</i>	<i>Interpretación</i>
Negativo	No mastitis (bajo RCS)
Trazas	Posible mastitis subclínica (ligero aumento de células somáticas)
1 +	Mastitis subclínica leve
2 +	Mastitis subclínica moderada
3 +	Mastitis subclínica severa

Nota: Adaptado de National Mastitis Council (2017).

Antes de realizar la recolección, los pezones de cada cuarto mamario fueron desinfectados cuidadosamente para retirar cualquier rastro de suciedad y microorganismos presentes en la superficie. Como parte del procedimiento, se eliminaron los primeros chorros de leche de cada cuarto con el fin de evitar que posibles contaminantes del canal del pezón ingresaran en la muestra (Rossi, 2018). Una vez obtenido el diagnóstico, se identificó al animal del cual se extraería la muestra y se continuó con la recolección utilizando frascos estériles. Se depositó un volumen aproximado de 10 mL y las muestras

fueron mantenidas en refrigeración para conservar la viabilidad de los microorganismos (Avellan et al., 2019).

4.5.2.2 Métodos de identificación de *Staphylococcus aureus*

*4.5.2.2.1 Aislamiento e identificación Microbiológica de *S. aureus* utilizando Manitol Salado*

Para el aislamiento de *S. aureus* en muestras de leche con mastitis, se utilizó agar manitol salado (AMS) como medio selectivo, ya que permite inhibir el crecimiento de microorganismos distintos a los estafilococos. En este medio, los estafilococos coagulasa-positivos, como *S. aureus*, son capaces de fermentar el manitol, originando colonias de color amarillo acompañadas de halos igualmente amarillos debido a la variación del pH (Pasachova, 2019). El AMS se preparó disolviéndolo en agua destilada y posteriormente se esterilizó en autoclave durante una hora y media. Luego, se distribuyeron 20 mL en placas Petri estériles y se dejaron solidificar a temperatura ambiente.

Posteriormente, se inoculó 1 mL de la muestra de leche en cada placa se realizó un raspado en forma de zigzag y estas fueron incubadas a 37 °C durante un periodo de 24 horas. La aparición de colonias amarillas con un halo del mismo tono permitió reconocer de manera preliminar la presencia de *S. aureus*, evidenciando su característica capacidad de fermentar el manitol (Tsegmed Pringle, 2012)

4.6 Variable independiente

La concentración de propóleo utilizada en el tratamiento:

- Dosis 10 mg/ml
- Dosis 15 mg/ml

- Dosis 20 mg/ml

4.7 Variable dependiente

- El crecimiento bacteriano en los cultivos in vitro, medido en términos de la inhibición o proliferación de la bacteria *Staphylococcus aureus*.

La proliferación bacteriana de *Staphylococcus aureus* fue analizada usando la técnica de difusión en medio sólido, un método común para evaluar la eficacia antimicrobiana de compuestos tanto naturales como artificiales.

Para llevar a cabo esto, se reactivaron las cepas bacterianas que habían sido previamente reconocidas en un medio nutritivo e incubadas a 37°C durante un lapso de 24 horas. Luego, la suspensión bacteriana se ajustó a una densidad similar a la norma 0.5 de McFarland, lo cual es aproximadamente equivalente a una concentración de 1.5×10^8 UFC/ml.

Una vez que la suspensión fue estandarizada, se sembró a través de un método de extensión sobre placas de agar Mueller-Hinton, empleando un hisopo estéril para garantizar que el inóculo se distribuyera de manera uniforme sobre la superficie del medio.

A continuación, se colocaron discos estériles que contenían diferentes concentraciones del extracto acuoso de propóleo (10, 15 y 20 mg/ml), además de un disco con cefalexina (1 mg/ml) que funcionó como control positivo.

Las placas se incubaron a 37° C durante un día. Al finalizar la incubación, se registraron los diámetros de los halos de inhibición (en milímetros) alrededor de cada disco, utilizando un calibrador digital para medir.

La interpretación del crecimiento bacteriano se realizó de la siguiente manera:

Halo de inhibición presente → actividad antimicrobiana (inhibición del crecimiento).

Sin halo → crecimiento bacteriano sin efecto de inhibición.

Este método se basa en el protocolo estandarizado establecido por el Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio (CLSI), que proporciona las pautas para la evaluación de la susceptibilidad antimicrobiana mediante la técnica de difusión en disco (CLSI, 2023).

CAPITULO V

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Prueba de Normalidad de Shapiro-Wilks y Homogeneidad de Varianza de Levene.

Luego de realizar la prueba de normalidad de Shapiro-Wilks y la prueba de homogeneidad de varianza de Levene; podemos observar en la Tabla 3 que los valores de $p > 0.05$ en la prueba de normalidad sugieren una distribución normal de los datos, mientras que los valores de $p > 0.05$ en el test de Levene confirman la homogeneidad en las varianzas.

Tabla 3.

Prueba de Normalidad y Homogeneidad de Varianzas.

Variable	Observaciones	Promedio	Desviación estándar	Shapiro - test		Levene - test	
				W	p-Value	F	p-Value
Ensayo 1 – 24 horas	20	21,76	7,09	0,956	0,462	0,065	0,978
Ensayo 2 – 48 horas	20	21,67	7,01	0,959	0,521	0,600	0,625
Ensayo 3 – 72 horas	20	21,95	7,19	0,959	0,528	0,641	0,599
Ensayo 4 – 96 horas	20	21,53	7,31	0,959	0,527	1,508	0,250
Ensayo 5 – 120 horas	20	21,75	7,21	0,985	0,982	2,035	0,150

Los resultados de este estudio, que muestran normalidad y homogeneidad de varianzas ($p > 0,05$), son coherentes con lo descrito en investigaciones previas sobre la actividad antimicrobiana del propóleo. Bankova et al. (2016) señalan que los ensayos microbiológicos con propóleo suelen presentar baja dispersión y distribución cercana a la normal debido a la estabilidad de sus compuestos fenólicos. De igual forma, Kujumgiev et al. (2018) reportan varianzas homogéneas y coeficientes de variación reducidos en pruebas de inhibición bacteriana, lo que respalda el uso de ANOVA. (Ruegg, 2017) también destaca que la reproducibilidad de los extractos de propóleo favorece distribuciones paramétricas consistentes. En conjunto, estos antecedentes confirman que el comportamiento estadístico encontrado en la presente investigación es congruente.

5.2 Análisis de la Variable Ensayo 1 a las 24 horas

Luego del análisis de varianza realizado para el Ensayo 1, en la Tabla 4 se evidencia que existen diferencias altamente significativas entre los tratamientos evaluados ($p < 0.0001$).

Tabla 4.

Análisis de varianza del diámetro de los halos de inhibición obtenidos en el primer ensayo realizado a las 24 horas de incubación.

<i>Fuente</i>	<i>GL</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Cuadrados medios</i>	<i>F</i>	<i>Pr > F</i>	<i>p-values signification codes</i>
<i>Modelo</i>	3	944.01	314.67	472.97	<0,0001	***
<i>Total corregido</i>	19	954.66				
<i>Tratamiento</i>	3	944.01	314.67	472.97	<0,0001	***
<i>Error</i>	16	10.64	0.67			

Calculado contra el modelo $Y=Media(Y)$

*Signification codes: 0 < *** < 0.001 < ** < 0.01 < * < 0.05 < . < 0.1 < ° < 1*

Promedio (mm) 21.76

CV (%) 3.75

El modelo explica prácticamente toda la variabilidad observada en los datos, lo que refleja un efecto marcado de los tratamientos sobre el diámetro del halo de inhibición. El error experimental fue bajo y el coeficiente de variación (3,75%), confirmando que las diferencias detectadas no se deben al azar, sino al efecto real de cada tratamiento sobre la respuesta microbiológica.

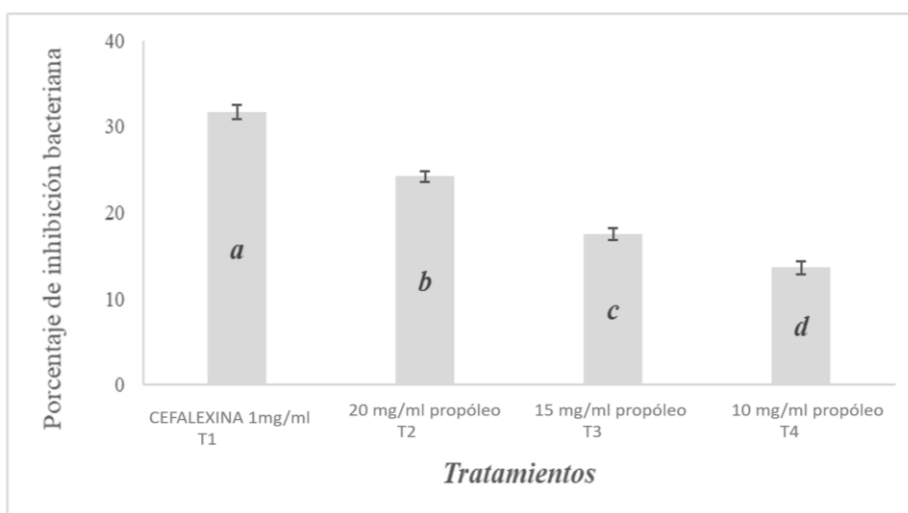
5.2.1 Prueba de comparación múltiple de promedios de Tukey al 5% del Ensayo 1 a las 24 horas

La prueba de Tukey permitió agrupar los tratamientos en cuatro rangos estadísticos diferenciados. La cefalexina (1 mg/mL) presentó el mayor efecto inhibitorio, seguida por el propóleo a 20 mg/mL. Posteriormente se ubicó la concentración de 15 mg/mL, mientras que el menor efecto correspondió al propóleo a 10 mg/mL.

Estos resultados evidencian un comportamiento dosis-dependiente del propóleo, donde el incremento de concentración aumenta el diámetro del halo de inhibición bacteriana.

Figura 2.

Porcentaje de inhibición de la bacteria aplicando la prueba Tukey al 5%.



Según el análisis estadístico mediante la prueba de Tukey al 5%, se identificaron cuatro rangos de significancia en los tratamientos evaluados. La Cefalexina 1 mg/mL mostró el mayor porcentaje de inhibición bacteriana (31,688%), ubicándose en el primer lugar, en el segundo rango se ubicó el propóleo a 20 mg/mL, con una inhibición de 24,214%. Estos resultados concuerdan con los reportados por Cetin et al. (2010), quienes encontraron que extractos de propóleo al 20% m/v generan halos de inhibición significativamente mayores frente a *Staphylococcus aureus* y *E. coli*, en comparación con concentraciones inferiores. De manera similar, (Tsegmed Pringle, 2012) demostraron que el propóleo al 20% presenta la actividad antibacteriana más elevada en comparación con 10% y 5%.

El siguiente rango de significancia lo alcanzó la concentración de 15 mg/mL, con una inhibición de 17,538%. Aunque esta dosis mostró un efecto intermedio, fue estadísticamente inferior al 20 mg/mL. Resultados equivalentes fueron obtenidos por (Sforcin, J.M., & Bankova, V., 2011) quienes observaron que concentraciones de propóleo al 15% mantienen actividad relevante, pero disminuyen frente a concentraciones del 20–25%, indicando una clara relación dosis-respuesta.

Finalmente, el rango más bajo correspondió al propóleo 10 mg/mL, cuyo efecto de inhibición (13,612%) fue el menor entre los tratamientos. Este comportamiento coincide con los experimentos de Marcucci (2017) y (Dario, 2024) quienes determinaron que concentraciones al 10% poseen actividad antibacteriana limitada debido a la menor disponibilidad de compuestos fenólicos. Asimismo, Lima et al. (2014) confirmaron que incrementos desde 10% hasta 20% producen aumentos proporcionales en la inhibición de *S. aureus*.

En conjunto, estos resultados respaldan una relación dosis-dependiente del propóleo, donde el incremento desde 10 mg/mL → 20 mg/mL mejora notablemente el efecto inhibitorio.

5.3 Análisis de varianza del Ensayo 2 a las 48 horas

El análisis de varianza evidenció diferencias altamente significativas entre tratamientos ($p < 0,0001$) Tabla 5. El coeficiente de variación fue bajo (2,69%), indicando alta precisión experimental y consistencia en las mediciones del diámetro del halo de inhibición.

Tabla 5.

Análisis de varianza de la variable mediciones de halos de inhibición del Ensayo 2

<i>Fuente</i>	<i>GL</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Cuadrados medios</i>	<i>F</i>	<i>Pr > F</i>	<i>p-values significatio n codes</i>
Modelo	3	928.807	309.602	910.917	<0,0001	***
Total corregido	19	934.245				
Tratamiento	3	928.807	309.602	910.917	<0,0001	***
Error	16	5.438	0.340			

Calculado contra el modelo $Y=Media(Y)$

*Signification codes: 0 < *** < 0.001 < ** < 0.01 < * < 0.05 < . < 0.1 < ° < 1*

Promedio (mm) 21.67

CV(%) 2.6908164

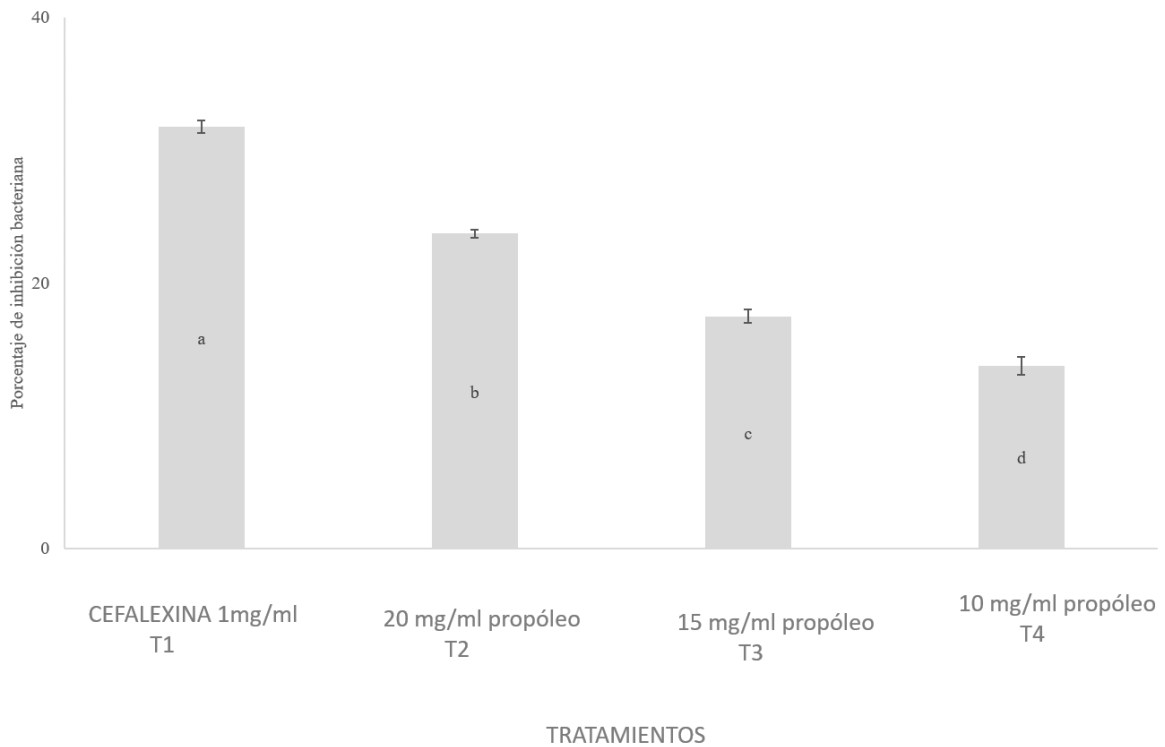
5.3.1 Prueba de comparación múltiple de promedios de Tukey al 5% del Ensayo 2 a las 48 horas

La prueba de Tukey separó los tratamientos en cuatro grupos estadísticamente distintos.

La cefalexina (1 mg/mL) presentó el mayor diámetro de inhibición, seguida por el propóleo a 20 mg/mL. En un nivel intermedio se ubicó la concentración de 15 mg/mL, mientras que el menor efecto correspondió al propóleo a 10 mg/mL.

Figura 3.

Prueba de comparación múltiple de promedios de Tukey al 5% de la variable



El comportamiento observado confirma nuevamente una relación dosis-respuesta del propóleo sobre la inhibición bacteriana a las 48 horas de incubación.

Resultados similares han sido descritos por (Villalobos, 2017) quien reporta mayor actividad antimicrobiana en concentraciones altas de propóleo. Asimismo, Velázquez et al. (2022) y (Bedruddin, 2023) indican que la disminución de concentración reduce progresivamente el efecto inhibitorio debido a la menor disponibilidad de compuestos fenólicos activos.

En consecuencia, el incremento de la concentración de propóleo aumenta la capacidad inhibitoria bacteriana, manteniendo el mismo patrón observado en el primer ensayo.

5.4 Análisis del Ensayo 3 a las 72 horas

El análisis de varianza evidenció diferencias altamente significativas entre tratamientos ($p < 0,0001$) (Tabla 6). El coeficiente de variación (3,89%) indicó adecuada precisión experimental, confirmando consistencia en las mediciones del diámetro del halo de inhibición.

Tabla 6.

Análisis de varianza de la variable mediciones de halos de inhibición de la Ensayo 3

<i>Fuente</i>	<i>GL</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Cuadrados medios</i>	<i>F</i>	<i>Pr > F</i>	<i>p-values significatio n codes</i>
Modelo	3	969.829	323.276	442.637	<0,0001	***
Total corregidc	19	981.514				
Tratamiento	3	969.829	323.276	442.637	<0,0001	***
Error	16	11.685	0.730			

Calculado contra el modelo $Y=Media(Y)$

*Signification codes: 0 < *** < 0.001 < ** < 0.01 < * < 0.05 < . < 0.1 < ° < 1*

Promedio (mm) 21.95
CV(%) 3.893308963

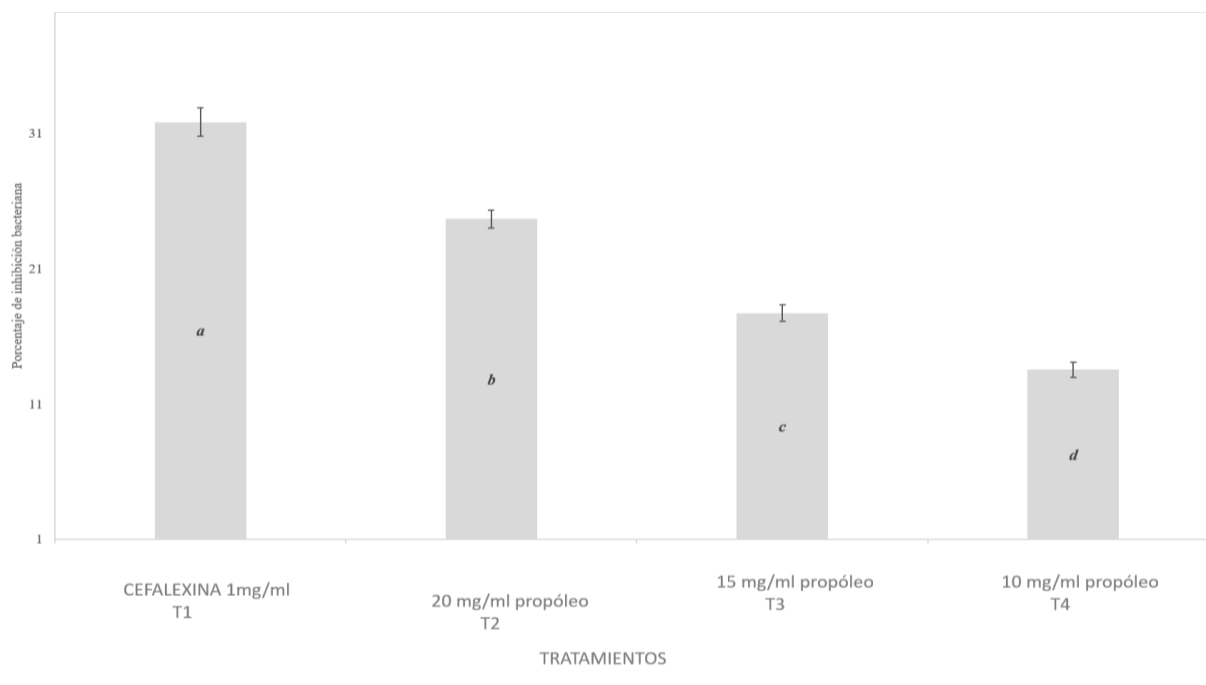
La mayor parte de la variabilidad total es explicada por el efecto del tratamiento, lo cual evidencia una respuesta marcada de los tratamientos sobre la variable evaluada. El nivel de error experimental fue reducido y el coeficiente de variación (3,89%) indica una alta precisión y uniformidad en las mediciones, de modo que los resultados obtenidos reflejan de manera confiable el comportamiento real de los tratamientos en este ensayo.

5.4.1 Prueba de comparación múltiple de promedios de Tukey al 5% del Ensayo 3

La comparación múltiple de promedios mediante la prueba de Tukey al 5% permitió establecer cuatro rangos de significancia entre los tratamientos evaluados. El valor más alto correspondió al tratamiento de referencia, con un porcentaje de inhibición de 31,850%, únicamente utilizado como punto comparativo para ordenar los rangos.

Figura 4.

Prueba de comparación múltiple de promedios



La prueba de Tukey agrupó los tratamientos en cuatro niveles estadísticamente distintos.

El tratamiento de referencia presentó el mayor diámetro de inhibición, seguido por el propóleo a 20 mg/mL, posteriormente el de 15 mg/mL y finalmente el de 10 mg/mL.

El patrón observado mantiene la tendencia concentración dependiente registrada en los ensayos anteriores, donde el incremento de concentración produce mayor inhibición bacteriana.

Resultados comparables han sido reportados por Díaz-Suyo y Proaño (2021) y Vallejo Argüello (2015), quienes observaron aumentos progresivos de la actividad antimicrobiana del propóleo conforme se incrementa su concentración. De manera similar, Kujumgiev et al. (2018) y (Bedruddin, 2023) describen que incluso concentraciones bajas

conservan actividad inhibitoria, aunque significativamente menor debido a la menor disponibilidad de compuestos fenólicos activos.

En conjunto, los resultados a las 72 horas confirman la estabilidad del efecto antibacteriano del propóleo y la persistencia del comportamiento dosis-respuesta observado en los ensayos previos.

5.5 Análisis de varianza del Ensayo 4 a las 96 horas

El análisis de varianza correspondiente al Ensayo 4 evidenció diferencias estadísticas entre tratamientos ($p < 0,0001$) (Tabla 7). Aunque el coeficiente de variación aumentó a 6,56%, se mantuvo dentro de límites aceptables, indicando consistencia experimental en las mediciones del diámetro del halo de inhibición.

Tabla 7.

Análisis de varianza de la variable mediciones de halos de inhibición del Ensayo 4

<i>Fuente</i>	<i>GL</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Cuadrados medios</i>	<i>F</i>	<i>Pr > F</i>	<i>p-values significatio n codes</i>
Modelo	3	1000.918	2.000	408.585	<0,0001	***
Total corregidc	19	1013.984				
Tratamiento	3	1000.918	333.639	408.585	<0,0001	***
Error	16	13.065	2.000			

Calculado contra el modelo $Y=Media(Y)$

*Signification codes: 0 < *** < 0.001 < ** < 0.01 < * < 0.05 < . < 0.1 < ° < 1*

Promedio (mm) 21.53
CV(%) 6.567961928

5.5.1 Prueba de comparación múltiple de promedios de Tukey al 5% del Ensayo 4 a las 96 horas

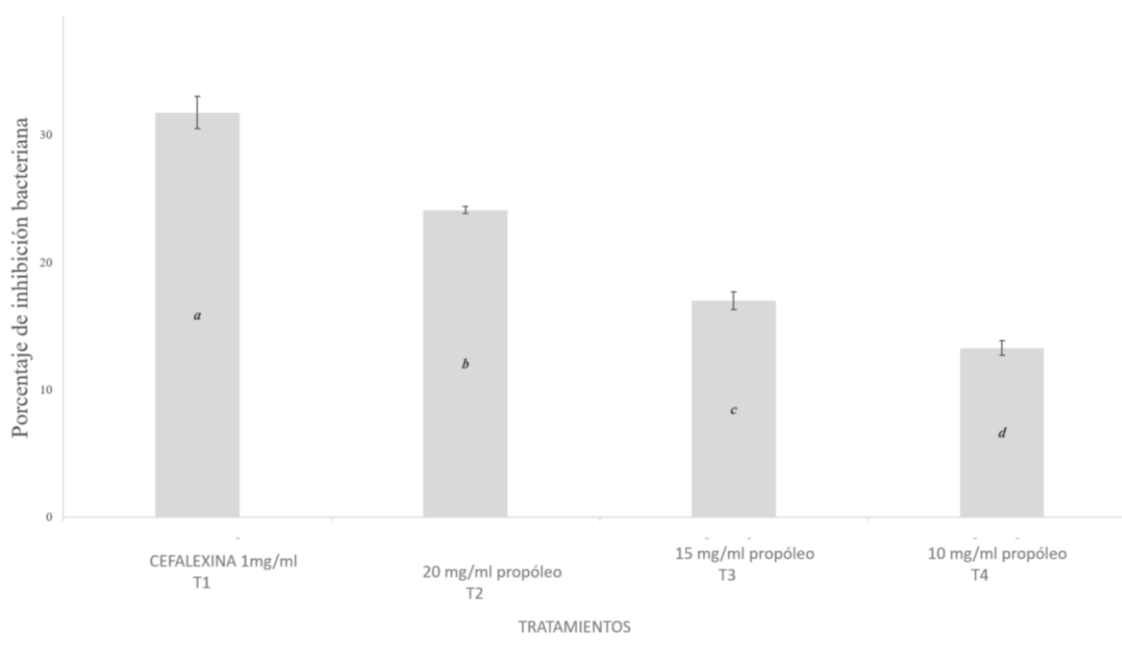
La prueba de Tukey permitió diferenciar cuatro grupos estadísticos.

El tratamiento de referencia presentó el mayor diámetro de inhibición, seguido por el propóleo a 20 mg/mL, posteriormente el de 15 mg/mL y finalmente el de 10 mg/mL.

A las 96 horas se mantiene el mismo orden observado en los ensayos previos, evidenciando persistencia del efecto inhibitorio del propóleo en el tiempo.

Figura 5.

Prueba de comparación múltiple de promedios de Tukey al 5% del Ensayo 4



Estudios como los de Díaz-Suyo y Proaño (2021) y Vallejo Argüello (2015) describen un comportamiento similar, donde el aumento de concentración incrementa la inhibición bacteriana. Asimismo, (Barkema H, W., Maicelo, J., & Corroto, F., 2018)

indican que extractos de menor concentración conservan actividad, aunque con menor intensidad debido a la reducción de compuestos fenólicos activos.

En conjunto, los resultados confirman que el efecto antibacteriano del propóleo se mantiene a las 96 horas y continúa mostrando un patrón dependiente de la concentración.

5.6 Análisis de varianza del Ensayo 5 a las 120 horas

En el análisis de varianza realizado para el Ensayo 5, se vuelve a observar que los tratamientos generan diferencias altamente significativas, con un $p < 0.0001$ que reafirma la existencia de diferencias significativas entre tratamientos.

Tabla 8.

Análisis de varianza de la variable mediciones de halos de inhibición del Ensayo 5

<i>Fuente</i>	<i>GL</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Cuadrados medios</i>	<i>F</i>	<i>Pr > F</i>	<i>p-values significatio n codes</i>
Modelo	3	977.659	325.886	466.864	<0,0001	***
Total corregidc	19	988.827				
Tratamiento	3	977.659	325.886	466.864	<0,0001	***
Error	16	11.169	0.698			

Calculado contra el modelo $Y=Media(Y)$

*Signification codes: 0 < *** < 0.001 < ** < 0.01 < * < 0.05 < . < 0.1 < ° < 1*

Promedio (mm) 21.75
CV(%) 3.840773195

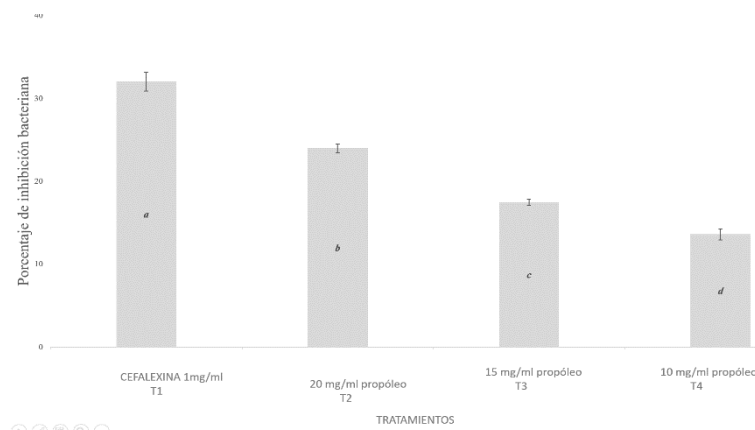
La casi totalidad de la variabilidad fue atribuida al efecto del tratamiento, lo que refleja una respuesta marcada de los tratamientos sobre la variable evaluada en este ensayo. El coeficiente de variación (3,84%) fue bajo, lo que indica una alta precisión y uniformidad en las mediciones, asegurando que las diferencias observadas son consistentes y reflejan fielmente el efecto real de cada tratamiento.

5.6.1 Prueba de comparación múltiple de promedios de Tukey al 5% del Ensayo 5 a las 120 horas

La prueba de Tukey diferenció cuatro grupos estadísticos. El tratamiento de referencia presentó el mayor diámetro de inhibición, seguido por el propóleo a 20 mg/mL, posteriormente el de 15 mg/mL y finalmente el de 10 mg/mL.

Figura 6.

Prueba de comparación múltiple de promedios de Tukey al 5% del Ensayo 5



A las 120 horas se mantiene el mismo orden observado en todos los ensayos previos, lo que evidencia persistencia del efecto inhibitorio del propóleo durante todo el periodo de incubación.

Estudios como los de Díaz-Suyo y Proaño (2021) y Vallejo Argüello (2015) describen un comportamiento similar, donde el incremento de concentración aumenta la inhibición bacteriana. Asimismo, (Benbassat, 2025) reporta que concentraciones bajas conservan actividad, aunque de menor intensidad.

En conjunto, los resultados confirman un comportamiento concentración dependiente y estable en el tiempo del efecto antibacteriano del propóleo frente a *Staphylococcus aureus* bajo condiciones in vitro.

CAPITULO VI

CONCLUSIONES

El propóleo acuoso presentó actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* en condiciones in vitro, evidenciada por la formación de halos de inhibición durante todos los ensayos realizados.

Se comprobó una relación concentración dependiente, donde el incremento de la concentración aumentó el diámetro del halo de inhibición. La concentración de 20 mg/mL mostró el mayor efecto dentro de los tratamientos con propóleo, manteniéndose por debajo pero cercano al antibiótico de referencia.

El análisis estadístico mediante ANOVA y la prueba de Tukey al 5% evidenció diferencias significativas entre tratamientos ($p < 0,0001$), confirmando que la respuesta observada se debe al efecto de las concentraciones evaluadas. Los coeficientes de variación bajos indicaron adecuada precisión experimental.

Los resultados obtenidos demuestran que el propóleo acuoso posee actividad antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* y puede considerarse un candidato con potencial para estudios posteriores orientados al desarrollo de alternativas para el control de mastitis bovina.

CAPITULO VII

RECOMENDACIONES

Realizar estudios in vivo en ganado bovino para evaluar la eficacia del propóleo acuoso bajo condiciones reales, considerando parámetros clínicos de mastitis, respuesta del animal, posibles reacciones adversas y comparación con tratamientos convencionales.

Emplear concentraciones cercanas a 20 mg/mL en investigaciones posteriores, debido a que esta dosis mostró la mayor inhibición frente a *Staphylococcus aureus*. Se recomienda evaluar diferentes formulaciones y comparar su efecto con antibióticos de uso habitual para determinar su desempeño relativo.

Profundizar en la caracterización química del propóleo utilizado, ya que su actividad antimicrobiana depende del origen botánico. La identificación de flavonoides, ácidos fenólicos y otros compuestos bioactivos permitiría relacionar su composición con la actividad antibacteriana observada.

Evaluar la estabilidad del extracto en el tiempo, considerando almacenamiento, temperatura y exposición a la luz, con el objetivo de estimar su vida útil potencial.

Estudiar la posible interacción entre propóleo y antibióticos comerciales mediante pruebas de sinergismo, para determinar si su combinación permite reducir dosis del antibiótico.

Desarrollar estudios aplicados orientados a evaluar su posible uso en sistemas productivos, incluyendo pruebas de campo, estabilidad del producto, vías de administración y aceptación por parte de los productores.

CAPITULO VIII

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abebe, R., Markos, A., Abera, M., & Mekbib, B. (2023). Incidence rate, risk factors, and bacterial causes of clinical mastitis on dairy farms in Hawassa City, southern Ethiopia. *Scientific Reports*, *13*(1), 10945. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-37328-1>
- Addis, M. F., Tanca, A., Uzzau, S., Oikonomou, G., Bicalho, R. C., & Moroni, P. (2016). The bovine milk microbiota: Insights and perspectives from -omics studies. *Molecular BioSystems*, *12*(8), 2359-2372. <https://doi.org/10.1039/C6MB00217J>
- Adkins, P. R. F., & Middleton, J. R. (2018). Methods for Diagnosing Mastitis. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, *34*(3), 479-491. <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2018.07.003>
- Aebi, M., van den Borne, B. H., Raemy, A., Steiner, A., Pilo, P., & Bodmer, M. (2023). Mycoplasma bovis infections in Swiss dairy cattle: A clinical investigation. *Acta Veterinaria Scandinavica*, *57*(1), 10. <https://doi.org/10.1186/s13028-015-0099-x>
- Akhtar, A. (2012). Prevalence of mastitis and identification of causitive pathogens in local and crossbred cows in dera ismail khan. *Pakistan Journal of Science*, *64*(3). <https://doi.org/10.57041/vol64iss3pp%2525p>
- Ali, M. A., Ahmad, M. D., Muhammad, K., & Anjum, A. A. (2011). Prevalence of sub clinical mastitis in dairy buffaloes of punjab, PAKISTAN. *J. Anim. Plant Sci.*, *21*(3), 477-480.
- Amer, S., Gálvez, F. L. A., Fukuda, Y., Tada, C., Jimenez, I. L., Valle, W. F. M., & Nakai, Y. (2018). Prevalence and etiology of mastitis in dairy cattle in El Oro Province, Ecu2ador. *Journal of Veterinary Medical Science*, *80*(6), 861-868. <https://doi.org/10.1292/jvms.17-0504>
- Arequipa Vilca, D. L., Cuji Suqui, J. M., Guamán Cargua, P. E., & González Salas, R. (2025). Método neutrosófico multicriterio para la evaluación del impacto de la mastitis bovina en la producción y calidad de la leche. *Neutrosophic Computing & Machine Learning*, *37*, 282.

- Ashraf, A., & Imran, M. (2018). Diagnosis of bovine mastitis: From laboratory to farm. *Tropical Animal Health and Production*, 50(6), 1193-1202.
<https://doi.org/10.1007/s11250-018-1629-0>
- Ashraf, A., & Imran, M. (2020). Causes, types, etiological agents, prevalence, diagnosis, treatment, prevention, effects on human health and future aspects of bovine mastitis. *Animal Health Research Reviews*, 21(1), 36-49.
<https://doi.org/10.1017/S1466252319000094>
- Abdellaou, M, Derouich M, & El-Rhaffari L. (202). *Essential oil chemical composition of wil an cultivated fennel (Foeniculum vulgare Mill)*. Obtenido de <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.09.004>
- Aiemsaaard J, Aiumlami S, Aromdee C & Khunklitti W. (2011). *The effect of lemongrass oil and its major components on clinical isolate mastitis pathogens and their mechanisms of action on Staphylococcus aureus* . Obtenido de <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.01.012>
- Asanza S., Castillo J. ,Loaiza S., Acosta, A., & Zuñiza L. (2024). *Identificación de Bacterias Gram positivas en muestras de leche cruda, obtenia por ordeño manual* . Obtenido de <https://doi.org/10.33996/revistaalfa.v8i22.249>
- Avellán, Velez,R.H., Zambrano Aguayo, M.D., De La Cruz, L. M. & Macias Moreira, Y.A. (2019). *prevalencia de mastitis subclinica en el ganado bovino, mediante la prueba california mastitis test, en el canton rocafuerte de la provincia de manabi, ecuador.* . obtenido de revista amazonica ciencia y tecnologia : <https://doi.org/10.5410/racyt-v08n01ep06-0108>
- Balouri, M., 2Sadiki, M., & Ibsouda S.K. . (2016). *Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity*. Obtenido de <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.05.053>
- Bankova, V. (2005). *Recent trends and important developments in propolis research. Evidence- Based Complementary and Alternative Medicine*, 2(1), 29-32.
- Barkema H, W., Maicelo, J., & Corroto, F. (2018). *The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine Staphylococcus aureus mastitis. Journal of Dairy Science*. Obtenido de <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8847>
- Bedruddin, M. (2023). *Review on mastitis and public health importance of mastitis causing pathogens in raw milk from mastitis infected dairy*. Obtenido de <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-3168508/v1>
- Benbassat, R. (2025). *Patógenos claves involucrados en la mastitis bovina Staphylococcus aureus y Streptococcus uberis*. Obtenido de <https://doi.org/10.3897/pharmacia.72.e140155>
- Bravo, J., Medina, J., Bajaan, A.,& Párraga J. (2024). *Mastitis subclínica con su impacto económico en hatos bovinos de doble proposito*. Obtenido de <https://doi.org/10.70165/cglobal.v9i2.416>

- Bujňáková, D., & Karahutová, L. (2024). *Molecular characteristics and antibiotic resistance of Staphylococcus aureus and Staphylococcus hamolyticus isolated from bovine mastitis. Research in Veterinary Science*. Obtenido de <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2024.105364>
- Bhargava, P., Mahanta, D., Kaul, A., Ishida, Y., Terao, K., Wadhwa, R., & Kaul, S. C. (2021). Experimental Evidence for Therapeutic Potentials of Propolis. *Nutrients*, 13(8), 2528. <https://doi.org/10.3390/nu13082528>
- Bitrus, A. A., Peter, O. M., Abbas, M. A., & Goni, M. D. (2018). Staphylococcus aureus: A Review of Antimicrobial Resistance Mechanisms. *Veterinary Sciences: Research and Reviews*, 4(2). <https://doi.org/10.17582/journal.vsr/2018/4.2.43.54>
- Bouchelaghem, S. (2022). Propolis characterization and antimicrobial activities against Staphylococcus aureus and Candida albicans: A review. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 29(4), 1936-1946. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2021.11.063>
- Bouchelaghem, S., Das, S., Naorem, R. S., Czuni, L., Papp, G., & Kocsis, M. (2022). Evaluation of Total Phenolic and Flavonoid Contents, Antibacterial and Antibiofilm Activities of Hungarian Propolis Ethanolic Extract against Staphylococcus aureus. *Molecules*, 27(2), 574. <https://doi.org/10.3390/molecules27020574>
- Brkić, I., & Puvača, N. (2024). Economic and Ecological Sustainability of Dairy Production. *Journal of Agronomy, Technology and Engineering Management (JATEM)*, 7(3), 1088-1104. <https://doi.org/10.55817/TQXU2115>
- Camacho, L. A. (2023). Resistencia bacteriana, una crisis actual. *Revista Española de salud pública*, 97. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10541255/>
- Campos, J. V. de, Assis, O. B. G., & Bernardes-Filho, R. (2020). Atomic force microscopy evidences of bacterial cell damage caused by propolis extracts on *E. coli* and *S. aureus*. *Food Science and Technology*, 40, 55-61. <https://doi.org/10.1590/fst.32018>
- Chaisri, W., Hennink, W. E., Ampasavate, C., & Okonogi, S. (2021). Cephalexin Microspheres for Dairy Mastitis: Effect of Preparation Method and Surfactant Type on Physicochemical Properties of the Microspheres. *AAPS PharmSciTech*, 11(2), 945-951. <https://doi.org/10.1208/s12249-010-9453-5>
- Chakraborty, S. D. (2019). *Technological interventions and advances in the diagnosis of intramammary infections in animals with emphasis on bovine population-a review. Veterinary Quarterly*, . Obtenido de <https://doi.org/10.1080/01652176.2019.1642546>

- Criscuolo, E. F. (2019). *Antimicrobial peptides and their activity against Staphylococcus aureus biofilms*. *Pathogens*, 8(3), 1-16. Obtenido de <https://doi.org/10.3390/pathogens8030161>
- Cheng, W. N., & Han, S. G. (2020). Bovine mastitis: Risk factors, therapeutic strategies, and alternative treatments — A review. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 33(11), 1699-1713. <https://doi.org/10.5713/ajas.20.0156>
- Church, N. A., & McKillip, J. L. (2021). Antibiotic resistance crisis: Challenges and imperatives. *Biologia*, 76(5), 1535-1550. <https://doi.org/10.1007/s11756-021-00697-x>
- Cobirka, M., Tancin, V., & Slama, P. (2020). Epidemiology and Classification of Mastitis. *Animals*, 10(12), 2212. <https://doi.org/10.3390/ani10122212>
- Corbellini, C. (2016). la mastitis bovina y su impacto sobre la calidad de la leche. *instituto nacional de tecnología agropecuaria*, 51. <https://ganaderiasos.com/wp-content/uploads/2025/05/be1c9-la-mastitis-bovina-y-su-impacto-sobre-la-calidad-de-la-leche.pdf>
- de Sá Assis, M. A., de Paula Ramos, L., Abu Hasna, A., de Queiroz, T. S., Pereira, T. C., Nagai de Lima, P. M., Berretta, A. A., Marcucci, M. C., Talge Carvalho, C. A., & de Oliveira, L. D. (2022). Antimicrobial and Antibiofilm Effect of Brazilian Green Propolis Aqueous Extract against Dental Anaerobic Bacteria. *Molecules*, 27(23), 8128. <https://doi.org/10.3390/molecules27238128>
- Dario, B. (2024). *Financial implicates of treating nonseyere gram-negative clinical mastitis in 3 California dairies*. Obtenido de <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2024.105365>
- Espinoza, M., & Mier, J. (2013). *Determinación de la prevalencia de mastitis mediante la prueba California Mastitis Test e identificación y antibiograma del agente causal en ganaderías lecheras del cantón El Chaco, provincia del Napo*. Obtenido de <https://www.dspace.uce.edu.ec/server/api/core/bitstreams/bb6385fa-3566-4fdea5b5-ae95180a60d9/content>
- Döpfer, D., Barkema, H. W., Lam, T. J. G. M., Schukken, Y. H., & Gaastra, W. (2018). Mastitis clínica recurrente causada por *Escherichia coli* en vacas lecheras. *Journal of Dairy Science*, 82(1), 80-85. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(99\)75211-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(99)75211-2)

- El-Sayed, A., & Kamel, M. (2021). Bovine mastitis prevention and control in the post-antibiotic era. *Tropical Animal Health and Production*, 53(2), 236.
<https://doi.org/10.1007/s11250-021-02680-9>
- Emiroglu, M., Akcan, A., Velidedeoglu, M., Girgin, S., Aytac, O., Canturk, N. Z., Yilmaz, K. B., Koksall, H., Cabioglu, N., Cetin, K., & Gulluoglu, B. (2024). Diagnosis, Approach, and Clinical Classification of Idiopathic Granulomatous Mastitis: Consensus Report. *Breast Care*, 19(5), 243-251. <https://doi.org/10.1159/000541482>
- Foster, T. J., Geoghegan, J. A., Ganesh, V. K., & Höök, M. (2014). Adhesion, invasion and evasion: The many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nature Reviews Microbiology*, 12(1), 49–62. . Obtenido de <https://doi.org/10.1038/nrmicro3161>
- Gebara, E. C. E., Lima, L. A., & Mayer, M. P. A. (2022). Propolis antimicrobial activity against periodontopathic bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, 33, 365-369.
<https://doi.org/10.1590/S1517-83822002000400018>
- Gaona, S., & Matabay, R. (2017). *Impacto de las Compras Públicas en las Asociaciones de Producción Textil de la Economía Popular y Solidaria en la Ciudad de Quito, en el Periodo 2014-2016*. Quito: Universidad Central del Ecuador. Obtenido de <http://www.dspace.uce.edu.ec:8080/bitstream/25000/10828/1/T-UCE-0005-100-2017.pdf>
- García, A. R. (2013). Evaluación de la capacidad antimicrobiana del extracto etanólico de propóleo. *Revista de Investigaciones Ahropecuarias*, 40 (2), 121-129.
- Gonçalves, J. L. (2018). *Bovine subclinical mastitis reduces milk yield and economic return* . Obtenido de <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12869>
- Gussmann, M., Steeneveld, W., Kirkeby, C., Hogeveen, H., Farre, M., & Halasa, T. (2019). Economic and epidemiological impact of different intervention strategies for subclinical and clinical mastitis. *Preventive Veterinary Medicine*, 166, 78-85.
<https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2019.03.001>
- Hogeveen, H., Steeneveld, W., & Wolf, C. A. (2019). Production Diseases Reduce the Efficiency² of Dairy Production: A Review of the Results, Methods, and Approaches Regarding the Economics of Mastitis. *Annual Review of Resource*

Economics, 11(Volume 11, 2019), 289-312. <https://doi.org/10.1146/annurev-resource-100518-093954>

Huan, Y. K. (2020). *Antimicrobial peptides: Classification, design, application and research progress in multiple fields*. *Frontiers in Microbiology*, 11, 582779.

Obtenido de <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.582779>

Huilca-Ibarra, M. P., Vasco-Julio, D., Ledesma, Y., Guerrero-Freire, S., Zurita, J., Castillejo, P., Barceló Blasco, F., Yanez, L., Changoluisa, D., Echeverría, G., Bastidas-Caldes, C., & Waard, J. H. de. (2022). High Prevalence of *Prototheca bovis* Infection in Dairy Cattle with Chronic Mastitis in Ecuador. *Veterinary Sciences*, 9(12), 659. <https://doi.org/10.3390/vetsci9120659>

[INIAP], I. N. (2021). *Manual de buenas practicas lecheras para pequeños productores*. .

Obtenido de <https://www.iniap.gob.ec>

Islam, M. M. (2025). *Prevalence, antibiotic resistance patterns, and virulence factors of Staphylococcus aureus isolates associated with bovine mastitis in northern Bangladesh*. *Heliyon*, 11(3). . Obtenido de

<http://doi.org/10.3897/pharmacia.72.e140155>

Islam, M. M., Hossain, M. I., Islam, M. S., Azam, M. G., & Sultana, S. (2025). *Prevalence, antibiotic resistance patterns, and virulence factors of Staphylococcus aureus isolates associated with bovine mastitis in northern Bangladesh*. *Heliyon*, 11(3). .

Obtenido de <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2025.e.42107>

Isidorov, V. A., Maslowiecka, J., Szoka, L., Pellizzer, N., Miranda, D., Olchowik-Grabarek, E., Zambrzycka, M., & Swiecicka, I. (2022). Chemical Composition and Biological Activity of Argentinian Propolis of Four Species of Stingless Bees. *Molecules*, 27(22), 7686. <https://doi.org/10.3390/molecules27227686>

- Jafari, A. &. (2019). *Antimicrobial effects of Rosmarinus officinalis methanolic extract on Staphylococcus aureus, Bacillus cereus, Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa2 in laboratory conditions. Journal of Medicinal and Chemical Science.*
- Kibebew, K. (2017). Bovine Mastitis: A Review of Causes and Epidemiological Point of View. *Journal of Biology*, 7(2). <https://core.ac.uk/download/pdf/234662234.pdf>
- Kumar, P., Deora, A., Sharma, H., Sharma, S., Mittal, D., Bhanot, V., Prakash, A., Yadav, R., & Diwakar, R. P. (2020). *Bovine Mastitis: A Review.* https://www.researchgate.net/profile/Raj-Diwakar/publication/348356273_Bovine_Mastitis_A_Review/links/5ff9d905a6fcdcdb8434f6c/Bovine-Mastitis-A-Review.pdf
- Kumari, T., Bhakat, C., & Singh, A. K. (2020). *Adoption of management practices by the farmers to control sub-clinical mastitis in dairy cattle.* 8(2), 924-927.
- Landi, J. P. (2024). Propóleo como alternativa para el tratamiento de mastitis subclínica bovina en la parroquia Cumbe. *Universidad Católica de Cuenca.* <https://dspace.ucacue.edu.ec/handle/ucacue/17898>
- Ley de Economía Popular y Solidaria.* (2012). Obtenido de <https://www.seps.gob.ec/wp-content/uploads/Reglamento-General-de-la-Ley-Organica-de-Economia-Popular-y-Solidaria.pdf>
- Martí-De Olives, A., Peris, C., & Molina, M. P. (2020). Effect of subclinical mastitis on the yield and cheese-making properties of ewe's milk. *Small Ruminant Research*, 184, 106044. <https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2019.106044>
- Martínez, A. (2022). *EL USO DE ANTIBIÓTICOS EN LA PRODUCCIÓN DE ALIMENTOS Y SU EFECTO SOBRE LA SALUD* [Universidad del País Vasco/ Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV/EHU)]. https://addi.ehu.es/bitstream/handle/10810/62405/TFG_Martinez.pdf?sequence=
- Mbindyo, C. M., Gitao, G. C., & Mulei, C. M. (2020). Prevalence, Etiology, and Risk Factors of Mastitis in Dairy Cattle in Embu and Kajiado Counties, Kenya. *Veterinary Medicine International*, 2020(1), 8831172. <https://doi.org/10.1155/2020/8831172>
- Medrano, C., Ahumada, D., Romero, J., & Donado, P. (2021). Prevalencia, incidencia y factores de riesgo de mastitis subclínica en lecherías especializadas en Colombia.

- Agronomía Mesoamericana*, 32(2), 487-507.
<https://doi.org/doi:10.15517/am.v32i2.43794>
- Michael, C. K., Lianou, D. T., Vasileiou, N. G. C., Mavrogianni, V. S., Petinaki, E., & Fthenakis, G. C. (2023). Longitudinal Study of Subclinical Mastitis in Sheep in Greece: An Investigation into Incidence Risk, Associations with Milk Quality and Risk Factors of the Infection. *Animals*, 13(20), 3295.
<https://doi.org/10.3390/ani13203295>
- Narváez-Semanate, J. L., Daza-Bolaños, C. A., Valencia-Hoyos, C. E., Hurtado-Garzón, D. T., Acosta-Jurado, D. C., Narváez-Semanate, J. L., Daza-Bolaños, C. A., Valencia-Hoyos, C. E., Hurtado-Garzón, D. T., & Acosta-Jurado, D. C. (2022). Diagnostic methods of subclinical mastitis in bovine milk: An overview. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 75(3), 10077-10088.
<https://doi.org/10.15446/rfnam.v75n3.100520>
- Pineda, M. R. B., del Rosario, E. H., & Villaflores, O. B. (2024). Use of veterinary medicinal products in the Philippines: Regulations, impact, challenges, and recommendations. *Journal of Veterinary Science*, 25(2), e33.
<https://doi.org/10.4142/jvs.23134>
- Pasachova, J. R. (2019). *Staphylococcus aureus: generalidades, mecanismo de patogenicidad y colonización celular*. *Nova*, 17(32): 25-38. Obtenido de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=s1794-247020190002000025&Ing=en
- Rodríguez, B., Canales, M. M., Penieres, J. G., & Cruz, T. A. (2020). Composición química, propiedades antioxidantes y actividad antimicrobiana de propóleos mexicanos. *Acta universitaria*, 30. <https://doi.org/10.15174/au.2020.2435>
- Rossi, A. L. (2019). *Methods for extraction and analysis of propolis: A review*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 172, 211–232.
- Rossi, R. S. (2018). *Diagnostic accuracy of Somatic cell, California Mastitis Test, and microbiological examination of composite milk to detect Streptococcus agalactiae intrammary infections*. *Journal of Dairy*, 101(11), 10220-10229. Obtenido de [8https://doi.org/10.3168/jds.2018-14672](https://doi.org/10.3168/jds.2018-14672)

- Ruegg, P. L. (2017). *A 100-year review: Mastitis detection, management, and prevention. Journal of Dairy Science, 100(12), 10381–10397.* Obtenido de <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13023>
- Ruegg. (2018). Pathogen-specific production losses in bovine mastitis. *Journal of Dairy Science, 101(10), 9493-9504.* <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14824>
- Sachuk, R. M., Stravsky, Y. S., Shevchenko, A. M., Katsaraba, O. A., Kostyshyn, Y. Y., & Zhyhalyuk, S. V. (2019). Distribution, etiology and prevention of subclinical mastitis in cows. *Ukrainian journal of veterinary and agricultural sciences, 2(2), 188-21.*
- Salatino, A. (2022). Perspectives for Uses of Propolis in Therapy against Infectious Diseases. *Molecules, 27(14), 4594.* <https://doi.org/10.3390/molecules27144594>
- Sanchez, P. (2018). The effect of climate change across food systems: Implications for nutrition outcomes. *Global Food Security, 18, 12-19.* <https://doi.org/10.1016/j.gfs.2018.06.001>
- Sforcin, J. M. (2016). Biological Properties and Therapeutic Applications of Propolis. *Phytotherapy Research, 30(6), 894-905.* <https://doi.org/10.1002/ptr.5605>
- Silva, A. C., Laven, R., & Benites, N. R. (2021). Risk Factors Associated With Mastitis in Smallholder Dairy Farms in Southeast Brazil. *Animals, 11(7), 2089.* <https://doi.org/10.3390/ani11072089>
- Stojanović, S. T., Najman, S. J., Popov, B. B., & Najman, S. S. (2020). Propolis: chemical composition, biological and pharmacological activity – a review. *Acta Medica Mediana, 59(2).* <https://aseestant.ceon.rs/index.php/amm/article/view/24920>
- Sforcin, J.M., & Bankova, V. (2011). *Propolis: Is there a potencial for the development of new drugs? Journal of Ethnopharmacology, 133(2) 253-260.*
- Tsegmed, U., Norma2nno, G., Pringle, M., & Krovacek, K. (2012). Obtenido de Occurrence of *Staphylococcus aureus* in milk and dairy products in Mongolia. *Food Control, 26(1), 149–155.*: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.01.017>
- Valdivia, A., Rubio, Y., Martínez, M., & Garrote, M. (2022). *Actividad antibacteriana de la Propolina frente a bacterias causantes de mastitis subclínica.* ResearchGate.

- https://www.researchgate.net/publication/373395539_Actividad_antibacteriana_de_la_PropolinaR_frente_a_bacterias_causantes_de_mastitis_subclinica
- Valdivieso, A., Siluk, C., & Michelin, C. (2022). Análisis Prospectivo Estratégico del Sector Textil Productivo Ecuatoriano para Incrementar la Competitividad en las Exportaciones. *SIGMA*, 13. doi:<https://doi.org/10.24133/sigma.v9i02.2827>
- Villalobos, C. B. (2017). *Actividad antibacteriana de un extracto acuoso de propóleo del municipio de Irapuato, Guanajuato, México*. Obtenido de <https://www.scielo.sa.cr/pdf/am/v28n1/43748637018.pdf>
- Vasquez, R., Ortega, N., Martínez, R., & Maldonado, W. (2012). *MANUAL TÉCNICO DE APICULTURA ABEJA (Apis mellifera)*. Corpoica. <https://corporacionbiologica.info/wp-content/uploads/2024/06/manual-tecnico-de-apicultura-abeja-Apis-mellifera.pdf>
- Woźniak, M., Sip, A., Mrówczyńska, L., Broniarczyk, J., Waśkiewicz, A., & Ratajczak, I. (2023a). Biological Activity and Chemical Composition of Propolis from Various Regions of Poland. *Molecules*, 28(1), 141. <https://doi.org/10.3390/molecules28010141>
- Woźniak, M., Sip, A., Mrówczyńska, L., Broniarczyk, J., Waśkiewicz, A., & Ratajczak, I. (2023b). Biological Activity and Chemical Composition of Propolis from Various Regions of Poland. *Molecules*, 28(1), 141. <https://doi.org/10.3390/molecules28010141>
- [INIAP], I. N. (2021). *Manual de buenas practicas lecheras para pequeños productores*. . Obtenido de <https://www.iniap.gob.ec>
- Abdellaou, M, Derouich M, & El-Rhaffari L. (2023). *Essential oil chemical composition of wil an cultivated fennel (Foeniculum vulgare Mill)*. Obtenido de <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.09.004>

- Aiemsraad J, Aiumlami S, Aromdee C & Khunklitti W. (2011). *The effect of lemongrass oil and its major components on clinical isolate mastitis pathogens and their mechanisms of action on Staphylococcus aureus* . Obtenido de <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2011.01.012>
- Ali, A. F. (2015). *Study of antibacterial activity in the local Iraqi propolis*. *Journal of Contemporary Medical Sciences*, 1(2), 6–8. Obtenido de https://applications.emro.who.int/imemrf/J_Contemp_Med_Sci/J_Contemp_Med_Sci_2015_1_2_6_8.pdf
- Asanza S., Castillo J. ,Loaiza S., Acosta, A., & Zuñiza L. (2024). *Identificación de Bacterias Gram positivas en muestras de leche cruda, obtenia por ordeño manual* . Obtenido de <https://doi.org/10.33996/revistaalfa.v8i22.249>
- Avellán, Velez,R.H., Zambrano Aguayo, M.D., De La Cruz, L. M. & Macias Moreira, Y.A. (2019). *Prevalencia de mastitis subclinica en el ganado bovino, mediante la prueba California Mastitis Test, en el canton Rocafuerte de la provincia de Manabi, Ecuador* . Obtenido de Revista Amazonica Ciencia y Tecnologia : <https://doi.org/10.5410/RACYT-v08n01ep06-0108>
- BalourI, M., Sadiki, M., & Ibnsouda, S. (2016). *Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity*. Obtenido de <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.05.053>
- Bankova, V. (2024). *Recent trends and important developments in propolis research*. *Evidence- Based Complementary and Alternative Medicine*, 2(1), 29-32.
- Barkema H, W., Maicelo, J., & Corroto, F. (2018). *The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine Staphylococcus aureus mastitis*. *Journal of Dairy Science*. Obtenido de <https://doi.org/10.3168/jds.2014-8847>

- Bedruddin, M. (2023). *Review on mastitis and public health importance of mastitis causing pathogens in raw milk from mastitis infected dairy*. Obtenido de <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-3168508/v1>
- Benbassat, R. (2025). *Patógenos claves involucrados en la mastitis bovina Staphylococcus aureus y Streptococcus uberis*. Obtenido de <https://doi.org/10.3897/pharmacia.72.e140155>
- Bravo, J., Medina, J., Bajaña, A., & Párraga J. (2024). *Mastitis subclínica con su impacto económico en hatos bovinos de doble proposito*. Obtenido de <https://doi.org/10.70165/cglobal.v9i2.416>
- Bujňáková, D., & Karahutová, L. (2024). *Molecular characteristics and antibiotic resistance of Staphylococcus aureus and Staphylococcus hamolyticus isolated from bovine mastitis. Research in Veterinary Science*. Obtenido de <https://doi.org/10.1016/j.rvsc2024.105364>
- Chakraborty, S. D. (2019). *Technological interventions and advances in the diagnosis of intramammary infections in animals with emphasis on bovine population-a review. Veterinary Quarterly*, . Obtenido de <https://doi.org/10.1080/01652176.2019.1642546>
- Criscuolo, E. F. (2019). *Antimicrobial peptides and their activity against Staphylococcus aureus biofilms. Pathogens*, 8(3), 1-16. Obtenido de <https://doi.org/10.3390/pathogens8030161>
- Dario, B. (2024). *Financial implicates of treating nonsevere gram-negative clinical mastitis in 3 California dairies*. Obtenido de <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2024.105365>
- Espinoza, M., & Mier, J. (2013). *Determinación de la prevalencia de mastitis mediante la prueba California Mastitis Test e identificación y antibiograma del agente causal*

- en ganaderías lecheras del cantón El Chaco, provincia del Napo*. Obtenido de <https://www.dspace.uce.edu.ec/server/api/core/bitstreams/bb6385fa-3566-4fdea5b5-ae95180a60d9/content>
- Foster, T. J., Geoghegan, J. A., Ganesh, V. K., & Höök, M. . (2014). *Adhesion, invasion and evasion: The many functions of the surface proteins of Staphylococcus aureus*. *Nature Reviews Microbiology*, *12*(1), 49–62. . Obtenido de <https://doi.org/10.1038/nrmicro3161>
- Gaona, S., & Matabay, R. (2017). *Impacto de las Compras Públicas en las Asociaciones de Producción Textil de la Economía Popular y Solidaria en la Ciudad de Quito, en el Periodo 2014-2016*. Quito: Universidad Central del Ecuador. Obtenido de <http://www.dspace.uce.edu.ec:8080/bitstream/25000/10828/1/T-UCE-0005-100-2017.pdf>
- García, A. R. (2013). Evaluación de la capacidad antimicrobiana del extracto etanólico de propóleo. *Revista de Investigaciones Ahropecuarias*, *40* (2), 121-129.
- Gonçalves, J. L. (2018). *Bovine subclinical mastitis reduces milk yield and economic return* . Obtenido de <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12869>
- Huan, Y. K. (2020). *Antimicrobial peptides: Classification, design, application and research progress in multiple fields*. *Frontiers in Microbiology*, *11*, 582779. Obtenido de <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.582779>
- Islam, M. M. (2025). *Prevalence, antibiotic resistance patterns, and virulence factors of Staphylococcus aureus isolates associated with bovine mastitis in northern Bangladesh*. *Heliyon*, *11*(3) . Obtenido de <http://doi.org/10.3897/pharmacia.72.e140155>
- Islam, M. M., Hossain, M. I., Islam, M. S., Azam, M. G., & Sultana, S. (2025). *Prevalence, antibiotic resistance patterns, and virulence factors of Staphylococcus aureus*

- isolates associated with bovine mastitis in northern Bangladesh. Heliyon, 11(3).* .
Obtenido de <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2025.e.42107>
- Islam, M. M., Hossain, M. I., Islam, M. S., Azam, M. G., & Sultana, S. (2025). *Prevalence, antibiotic resistance patterns, and virulence factors of Staphylococcus aureus isolates associated with bovine mastitis in northern Bangladesh. Heliyon, 11(3).*
Obtenido de <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2025.e42107>
- Jafari, A. &. (2019). *Antimicrobial effects of Rosmarinus officinalis methanolic extract on Staphylococcus aureus, Bacillus cereus, Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa in laboratory conditions. Journal of Medicinal and Chemical Science.*
- Ley de Economía Popular y Solidaria.* (2012). Obtenido de <https://www.seps.gob.ec/wp-content/uploads/Reglamento-General-de-la-Ley-Organica-de-Economia-Popular-y-Solidaria.pdf>
- Pasachova, J. R. (2019). *Staphylococcus aureus: generalidades, mecanismo de patogenicidad y colonización celular. Nova, 17(32): 25-38.* Obtenido de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=s1794-247020190002000025&Ing=en
- Rossi. (2018). *Diagnostic accuracy of Somaticell, California Mastitis Test, and microbiological examination of composite milk to detect Streptococcus agalactiae intrammary infections. Journal of Dairy, 101(11), 10220-10229.* Obtenido de <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14672>
- Rossi, A. L. (2019). *Methods for extraction and analysis of propolis: A review. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 172, 211–232.*
- Rossi, R. S. (2018). *Diagnostic accuracy of Somaticell, California Mastitis Test, and microbiological examination of composite milk to detect Streptococcus agalactiae*

- intrammary infections. Journal of Dairy, 101(11), 10220-10229. Obtenido de*
<https://doi.org/10.3168/jds.2018-14672>
- Ruegg, P. L. (2017). *A 100-year review: Mastitis detection, management, and prevention. Journal of Dairy Science, 100(12), 10381–10397. Obtenido de*
<https://doi.org/10.3168/jds.2017-13023>
- Sforcin, J.M., & Bankova, V. (2011). *Propolis: Is there a potencial for the development of new drugs? Journal of Ethnopharmacology, 133(2) 253-260.*
- Tsegmed Pringle. (2012). Obtenido de Occurrence of Staphylococcus aureus in milk and dairy products in Mongolia. *Food Control, 26(1), 149–155.:*
<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.01.017>
- Tsegmed, U., Normanno, G., Pringle, M., & Krovacek, K. (2012). Obtenido de Occurrence of Staphylococcus aureus in milk and dairy products in Mongolia. *Food Control, 26(1), 149–155.:* <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.01.017>
- Valdivieso, A., Siluk, C., & Michelin, C. (2022). Análisis Prospectivo Estratégico del Sector Textil Productivo Ecuatoriano para Incrementar la Competitividad en las Exportaciones. *SIGMA, 13. doi:https://doi.org/10.24133/sigma.v9i02.2827*
- Villalobos, C. B. (2017). *Actividad antibacteriana de un extracto acuoso de propóleo del municipio de Irapuato, Guanajuato, México. Obtenido de*
<https://www.scielo.sa.cr/pdf/am/v28n1/43748637018.pdf>

ANEXOS

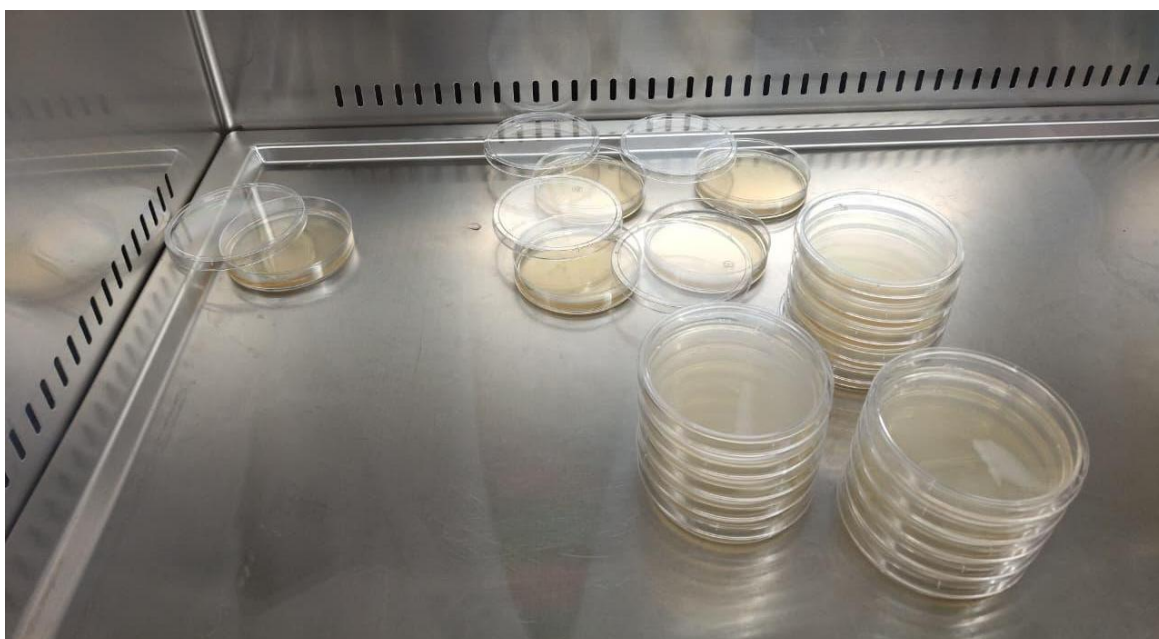
Anexo 1.

Datos Finales Obtenidos tras el estudio.

CÓDIGO	REPETICION	HALO DE INHIBICIÓN (mm) DIÁMETRO					PROMEDIO
		ENSAYO 1	ENSAYO 2	ENSAYO 3	ENSAYO 4	ENSAYO 5	
CONTROL +	I	31,48	31,32	30,06	29,96	30,88	31,81
	II	30,56	31,53	31,32	31,02	30,54	
	III	32,05	31,98	32,99	33,89	33,51	
	IV	33,12	32,56	32,87	31,99	33,02	
	V	31,23	31,32	32,01	31,95	32,15	
DOSIS 1 PROPOLEO 10mg/ml	I	14,01	13,98	14,35	13,65	14,05	13,55
	II	14,56	14,97	14,09	13,46	13,92	
	III	13,95	13,64	13,25	14,02	14,35	
	IV	12,56	12,98	13,01	12,75	12,98	
	V	12,98	13,2	13,01	12,46	12,58	
DOSIS 2 PROPOLEO 15mg/ml	I	17,22	16,69	16,99	16,19	17,07	17,44
	II	18,07	17,73	18,61	16,11	17,33	
	III	18,56	17,98	18,05	17,86	18,21	
	IV	17,25	18	17,95	17,54	17,32	
	V	16,59	16,99	17,05	17,26	17,38	
DOSIS 3 PROPOLEO 20mg/ml	I	24,9	23,81	25,71	24,03	23,59	24,13
	II	23,52	23,19	25,02	24,65	23,36	
	III	23,45	23,56	24,51	24,03	24,56	
	IV	24,51	23,99	24,51	23,75	23,64	
	V	24,69	23,9	23,65	24,07	24,62	

Anexo 2.

Preparación de las cajas Petri



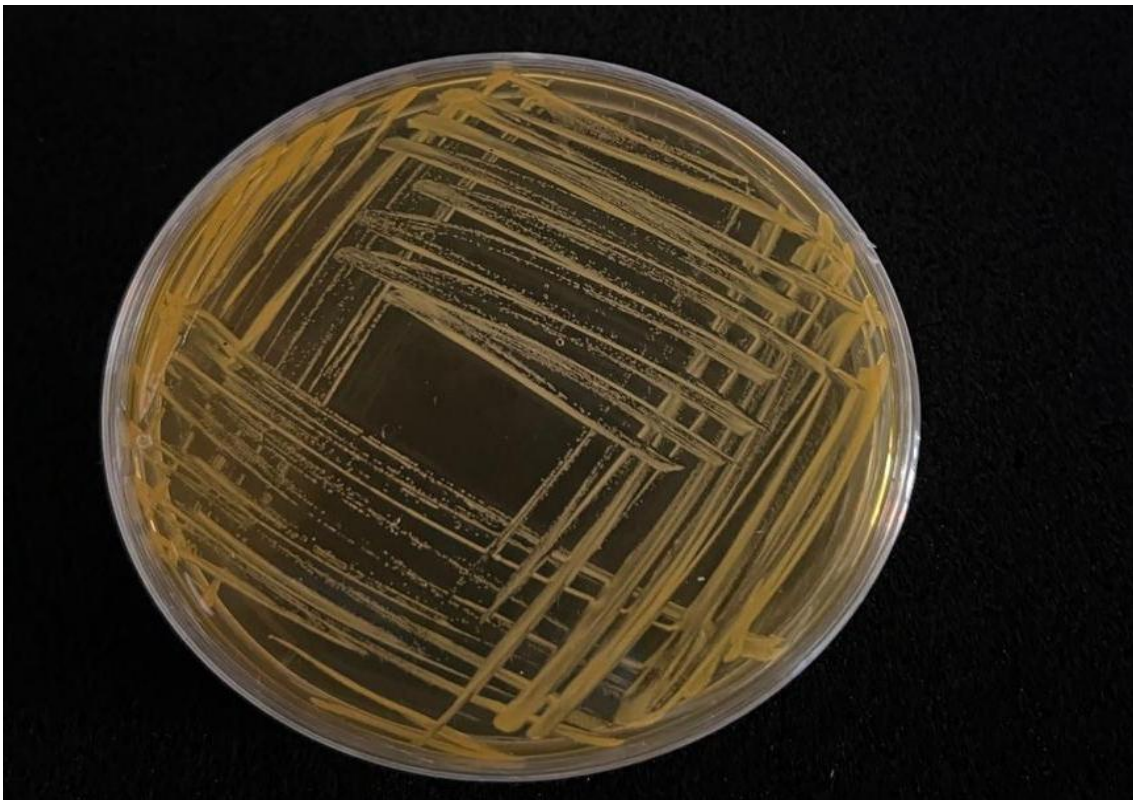
Anexo 3.

Preparación de los materiales



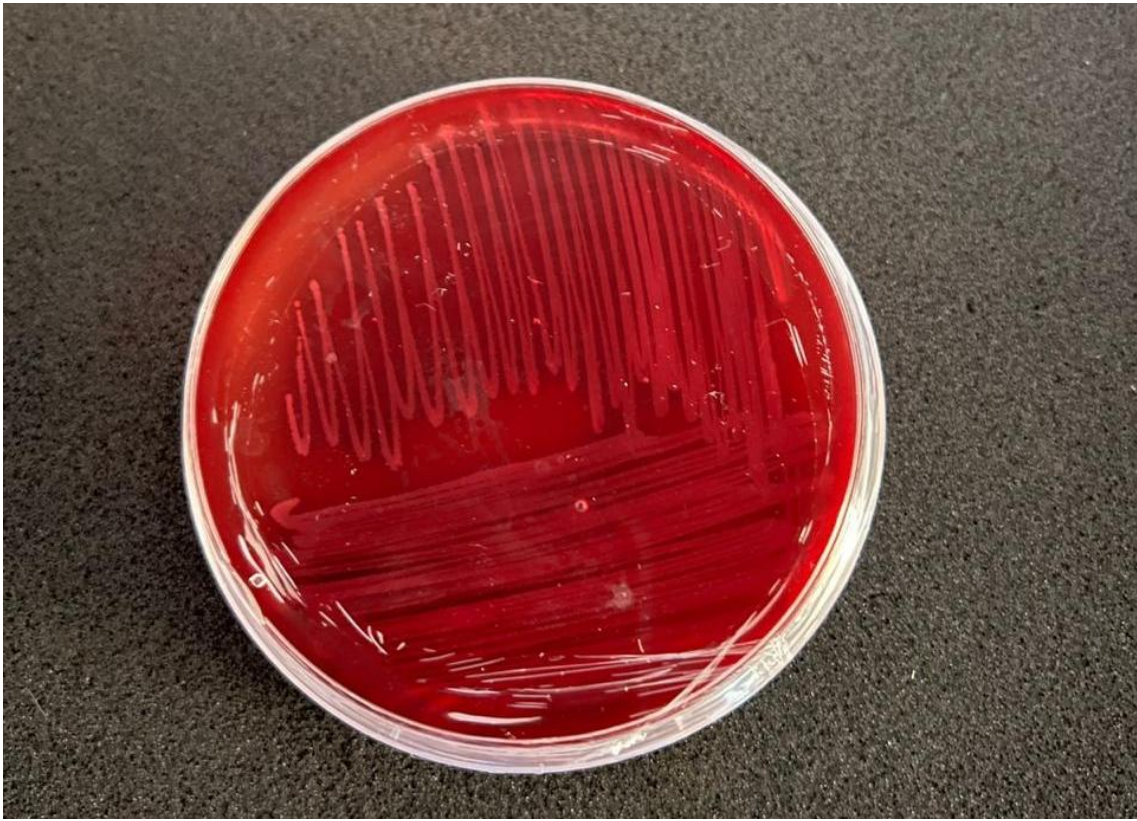
Anexo 4.

Identificación de Muestras Positivas Empleando Agar Manitol Salado.



Anexo 5.

Identificación de Muestras Positivas Empleando Agar Sangre



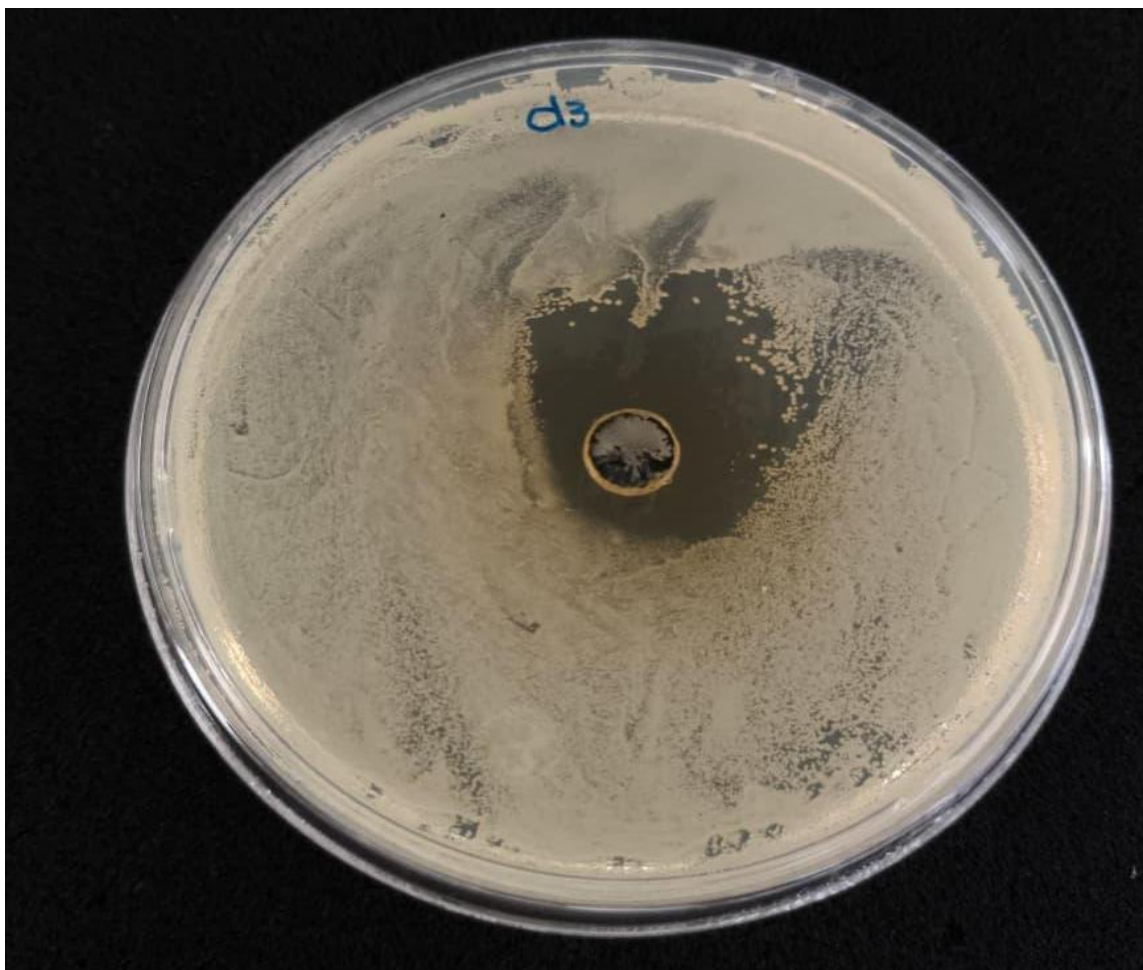
Anexo 6.

Enumeración de Cajas Petri



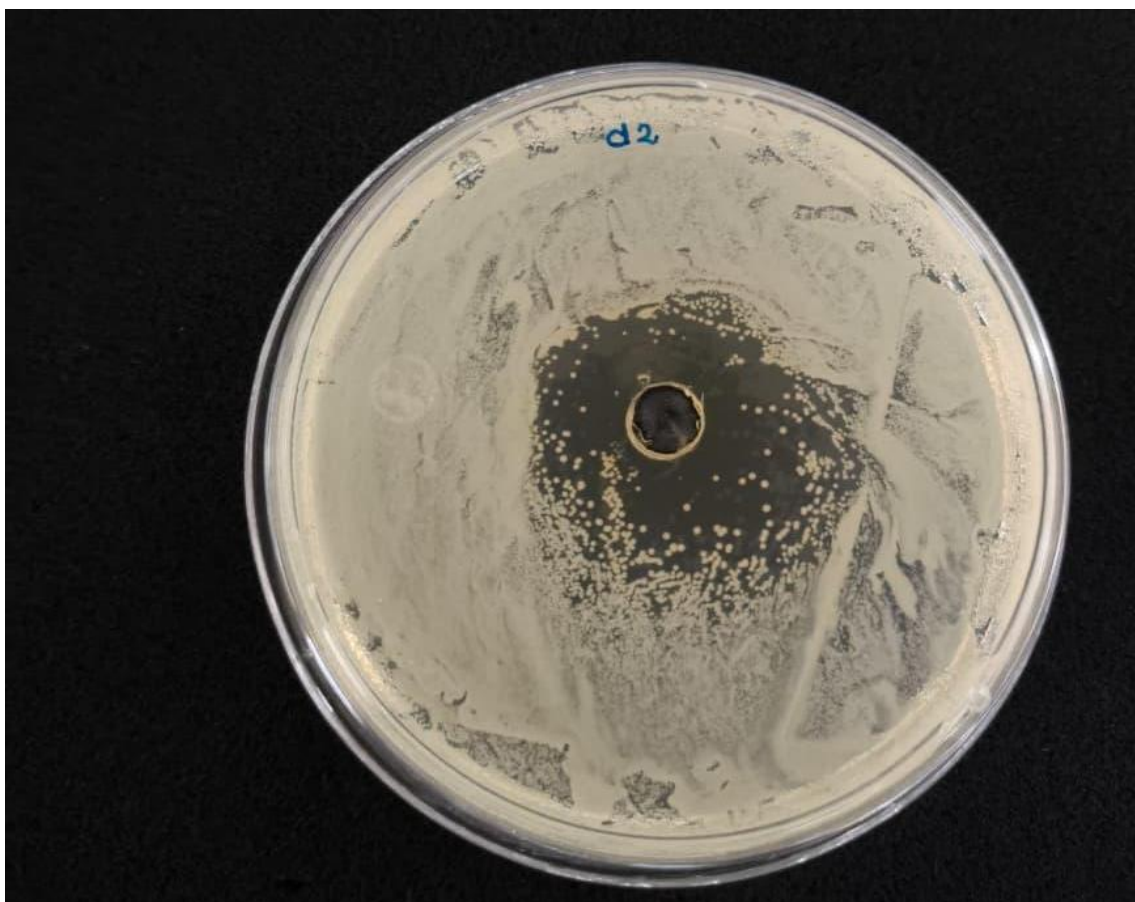
Anexo 7.

Halos de inhibición dosis empleada 20g/ml



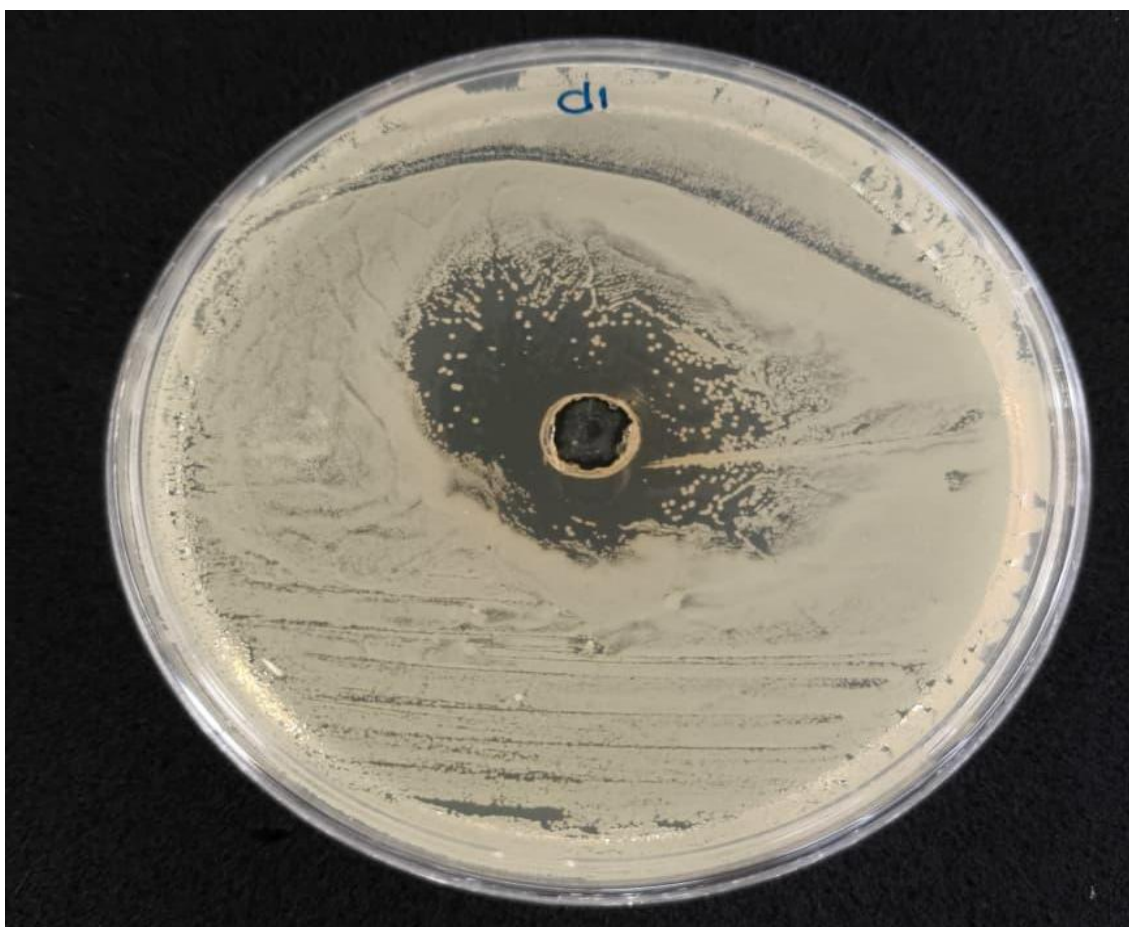
Anexo 8.

Halos de inhibición dosis empleada 15g/ml



Anexo 9.

Halos de inhibición dosis empleada 10g/ml



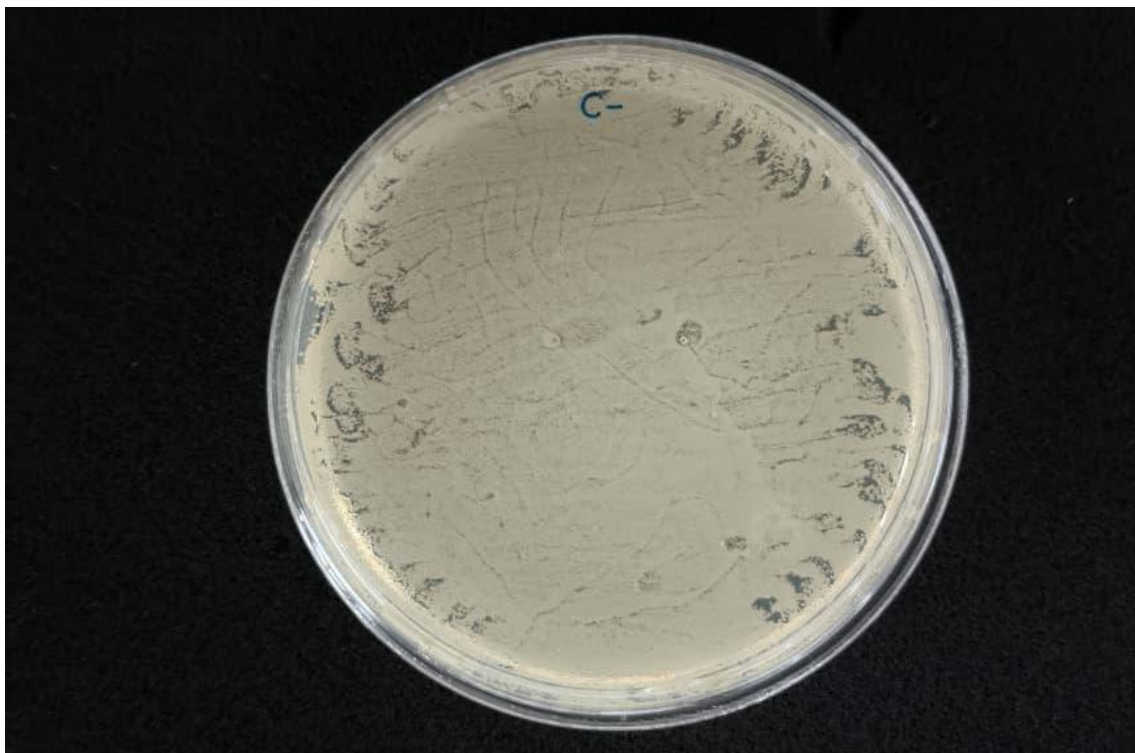
Anexo 10.

Halos de inhibición control positivo Cefalexina



Anexo 11.

Halos de inhibición sin dosis



Anexo 12.

Esterilización de las puntas utilizadas



Anexo 13.

Siembra de la Bacteria Staphylococcus aureus.



Anexo 14.

Siembra de la Bacteria Staphylococcus aureus

