



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITILÁN

**“EFECTO DEL PROPÓLEO SOBRE *Saprolegnia spp* Y EL
DESARROLLO DE UN COMPRIMIDO PARA LA
PREVENCIÓN DE LA SAPROLEGNOSIS”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTAN:

CINDY CONCEPCIÓN VASQUEZ RESENDIZ

TANIA JANITZY VASQUEZ RESENDIZ

ASESORES:

Dr. Tonatiuh Alejandro Cruz Sánchez

D. A. R. Juan José Díaz Esquivel

Dra. Amparo Londoño Orozco



**UNAM
CUAUTITLÁN**

Cuautilán Izcalli, Estado de México

2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

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

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

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

Efecto del propleo sobre Saprolegnia spp y el desarrollo de un comprimido para la prevención de la saprolegnosis

Que presenta la pasante: **Cindy Concepción Vasquez Resendiz**
Con número de cuenta: **408004688** para obtener el Título de: **Química Farmacéutica Bióloga**

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 04 de noviembre de 2013.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Tonatiuh Alejandro Cruz Sánchez	
VOCAL	QFB. Leticia Cubillo Carrillo	
SECRETARIO	QFB. Adriana Gil García	
1er. SUPLENTE	QFB. Laura Gricelda Martínez Méndez	
2do. SUPLENTE	M. en C. Heidi Johanna Amezcua Hempel	

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTO APROBATORIO



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

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

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

Efecto del propoleo sobre Saprolegnia spp y el desarrollo de un comprimido para la prevención de la saprolegnosis

Que presenta la pasante: Tania Janitz Vasquez Resendiz
Con número de cuenta: 408004695 para obtener el Título de: Química Farmacéutica Bióloga

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a de de 2013.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Tonatiuh Alejandro Cruz Sánchez	
VOCAL	QFB. Leticia Cubillo Carrillo	
SECRETARIO	QFB. Adriana Gil García	
1er. SUPLENTE	QFB. Laura Gricelda Martínez Méndez	
2do. SUPLENTE	M. en C. Heidi Johanna Amezcua Hempel	

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

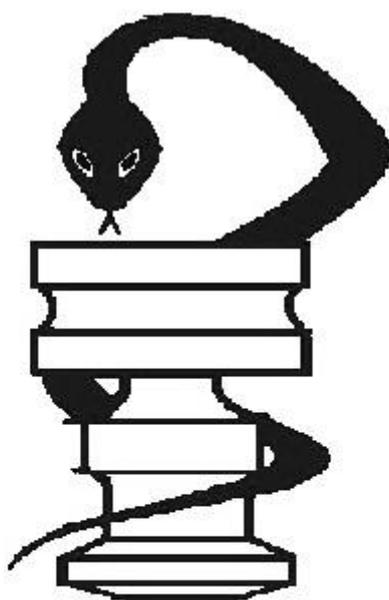
Investigación realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM 223811-3 Perspectivas del uso del propóleo en la salud animal. Agradezco la beca recibida para este proyecto Tania Janitzzy Vasquez Resendiz

Agradecemos a CICUAE, por las facilidades y el espacio asignado en la Unidad de Aislamiento y Bioterio de la FES Cuautitlán C-4, para realizar las pruebas experimentales de este proyecto.

El presente trabajo fue presentado en el VII CONGRESO NACIONAL DE MICOLOGÍA MÉDICA “Dr. Rubén López Martínez” del 17 al 19 de octubre del 2013 en la ciudad de Puebla, Puebla.



Agradecemos al Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico (LEDEFAR) por el apoyo, espacio, tiempo, dedicación y materiales recibidos para la realización de este trabajo.



LEDEFAR

**LABORATORIO DE
ENSAYOS DE DESARROLLO
FARMACÉUTICO**

AGRADECIMIENTOS.

El presente trabajo de tesis, primeramente queremos agradecerlo a ti Dios por bendecirnos para llegar hasta donde estamos hoy. A nuestro querido Niño de Atocha, porque cuando más necesitamos una luz de esperanza siempre estuviste de una u otra forma, porque renovamos la Fe en ti cada año en tu sagrado Santuario, porque hiciste realidad este sueño anhelado.

A nuestra querida Universidad, por abrirnos las puertas y darnos la oportunidad de ser parte tuya, por brindarnos conocimientos y oportunidades a manos llenas por esto y por mucho más con respeto y orgullo..... es un honor pertenecer a ti a la Máxima Casa de Estudios pos siempre Nuestra Alma Mater.

A la Faculta de Estudios Superiores Cuautitlán, por ser más que nuestra Universidad, porque por 5 años la consideramos nuestra segunda casa y que todo lo vivido lo llevaremos siempre en el corazón, siempre serás nuestro amado Campo 1.

Al motor que nos impulsa a no fallar por no fallarle a ellos, porque un logro nuestro también es suyo, porque son lo más valioso que tenemos: mamá, papá, Irving con el corazón en la mano les decimos ¡GRACIAS!.

A los profesores de carrera, ya que cada uno de ellos aportaron un granito de arena para nuestra formación, su entrega y su vocación sin duda son de mucha calidad esperamos haberlos explotado al máximo para representarlos dignamente en el campo laboral.

Al término de este proyecto queremos expresar todo nuestro agradecimiento a quienes con su ayuda, conocimiento y apoyo nos alentaron a lograr este trabajo...
Nuestros Asesores:

Al Dr. Tonatiuh Alejandro Cruz Sánchez y a la Dra. Amparo Londoño Orozco, gracias por la oportunidad que nos dieron al hacer esta tesis mancomunada, por

este maravilloso proyecto, por su tiempo, por su comprensión en momentos difíciles y por la confianza otorgada. Gracias por dejarnos hacer este viaje en compañía de ustedes.

Al D. A. R. Juan José Díaz Esquivel por su dedicación y entrega en todo momento, por apoyarnos en nuestras ideas más complejas ya que no solo nos ayudó a aterrizarlas, sino también a mejorarlas, sin su apoyo no sería igual el presente trabajo. Nuestra más grande admiración, respeto y gratitud.

A la Dra. Raquel López Arellano por su apoyo para llegar al término de este ciclo en nuestra preparación, por su esfuerzo, por hacer de nosotras unas profesionistas, y por la dedicación que siempre recibimos.

A la coordinadora de la carrera de QFB. Gricelda Martínez por siempre hacer un espacio para todo QFB en apuros, porque no hemos olvidado los esfuerzos que hizo por abrirnos grupos, porque ha dedicado hasta horas fuera de trabajo por informarnos y apoyarnos, porque siempre hubo una puerta abierta, porque siempre tuvo soluciones a nuestros problemas, por esto y por mucho más todo nuestro respeto y gratitud a la coordinadora por su trabajo, pero sobre todo a la persona tan humana que ha sido y que esperamos continúe así siempre.

Al encargado de la Unidad de Aislamiento y Bioterio Crisóforo Mercado Márquez. Por capacitarnos, orientarnos, asistirnos y por las facilidades brindadas para realizar el trabajo experimental.

A Marco Mendoza y a su equipo por la capacitación en el área de Microbiología y por su apoyo en general mostrando las grandes personas que son.

A los familiares que se nos adelantaron en el camino... pero que no se fueron porque siguen en nuestros pensamientos y se quedaron en nuestro corazón más vivos que nunca.

A nuestra querida tía Lili, por todo su cariño, bendiciones, buenos deseos y sus palabras que siempre nos impulsaron a seguir adelante.

A ti camio y a “las niñas de la camio”, que más que amigas fueron como unas verdaderas hermanas para nosotras, cómo olvidar las tardes de estudio en la camio o las escapadas para no pensar en los resultados de los exámenes. Todo lo que vivimos se quedará en nuestro corazón y esos lazos creados solo madurarán para que nuestra amistad sea más fuerte. Diana y Mitzi, saben que las queremos mucho, gracias por todo.

A Abdeel, Fercho y Puga, por presionarnos cada vez que nos veían diciendo: “¿Cómo va esa tesis?” y despedirse diciendo: “Ya saldrá”, gracias por aguantarnos y soportar ver Eclipse solo por acompañarnos, por cuidar ratas con nosotras... hay tanto por recordar que solo nos queda decirles ¡GRACIAS!.

A todos aquellos animalitos de laboratorio que colaboraron y NO colaboraron (los que escupieron y mordieron), como ratas, ratones, gallinas, embriones de pollo y peces que fueron parte fundamental para nuestro aprendizaje.

A todas las personas que de una u otra forma estuvieron presentes como familiares, amigos, conocidos, etc.; y los que tal vez no aparecen en esta lista porque son muchos y el espacio es poco, pero de antemano saben que parte importante ocupan ya que las palabras así como las críticas nos fortalecieron para hoy en día juntarnos y decir: ¡Por fin lo logramos!.

DEDICADO A.

El pilar que nos sostiene cuando no podemos más, por estar siempre compartiendo experiencias. Porque gracias a su apoyo, hemos logrado una de nuestras más ansiadas metas.

Ustedes, que sin esperar nada lo dieron todo. Porque nunca estuvimos solas, porque siempre contamos con su confianza. Porque nunca podremos pagar ni con los tesoros más grandes sus preocupaciones, desvelos y esfuerzos. Porque si algo nos lastimaba para ustedes el dolor era aún mayor, por gozar con nosotras y disfrutar nuestros triunfos y levantarnos en nuestros fracasos, por todo esto queremos que sientan que este objetivo logrado, también es suyo y que la fuerza que nos ayudó a conseguirlo fue su amor y su confianza. Con cariño, admiración, respeto y un profundo agradecimiento este trabajo está dedicado a nuestra maravillosa familia.

A nuestros queridos padres que nos dieron una familia como ninguna:

Calixto Vázquez Martínez

Y

Silvia Reséndiz Elizondo

A nuestro hermano quien a pesar de todo ha sido cómplice y amigo en todo momento:

Irving Calixto Vasquez Reséndiz

Querido Oso, esto que hoy logramos te lo dedicamos con mucho cariño, esperando que sea importante para ti y que con esto te motives y logres tus metas y en un futuro no muy lejano logres ser un profesionalista, ahora solo faltas tú y estamos seguras de que lo lograrás y no como una exigencia, sino como un regalo para la familia y no olvides que siempre que lo necesites estaremos contigo apoyándote, siempre... todo el tiempo.

INDICE

	Página
1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	3
2.1. <i>Saprolegnia</i>	3
2.1.1 MORFOLOGÍA Y CLASIFICACIÓN.....	3
2.1.2 HÁBITAT	6
2.1.3 REPRODUCCIÓN Y COMPORTAMIENTO.....	6
2.2. SAPROLEGNOSIS.....	8
2.2.1 CAUSAS.....	9
2.2.2 PATOGENIA	9
2.2.3 TRATAMIENTO	10
2.3. PROPÓLEO.....	11
2.3.1. COMPOSICIÓN QUÍMICA.....	12
2.3.2. ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA.....	14
2.3.3. EFECTO ANTIMICÓTICO DEL PROPÓLEO.....	15
2.3.4. PROPÓLEOS MEXICANOS.....	16
2.4. COMPRIMIDOS.....	17
2.4.1 DEFINICIÓN.....	18
2.5. VÍAS DE FABRICACIÓN DE COMPRIMIDOS.....	18
2.5.1 CARACTERÍSTICAS DE LAS FORMULACIONES	19
PARA COMPRESIÓN DE ACUERDO A LA VÍA DE FABRICACIÓN	
2.6. COMPRESIÓN DIRECTA.....	20
2.6.1 ETAPAS DEL PROCESO DE COMPRESIÓN	22
2.7. LIBERACIÓN MODIFICADA.....	25
2.7.1. DEFINICIÓN.....	26
2.7.2. CLASIFICACIÓN.....	26
3. OBJETIVOS.....	27
4. HIPÓTESIS.....	28
5. JUSTIFICACIÓN.....	29
6. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	30
7. MATERIAL Y MÉTODOS.....	32

7.1.	PRUEBA DE INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO RADIAL	32
7.2.	DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) POR EL MÉTODO DE DILUCIÓN EN PLACA DE 24 POZOS.....	32
7.3.	COMPARACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE <i>Saprolegnia spp</i>	33
7.4.	ELABORACIÓN DEL BOLO DE LIBERACIÓN MODIFICADA	
7.5.	PRUEBAS <i>In vivo</i>	33
7.5.1.	PRUEBA DE TOXICIDAD DE LOS BOLOS.....	36
7.5.2.	PRUEBA DE EFECTIVIDAD DE LOS BOLOS.....	38
8.	RESULTADOS.....	39
9.	DISCUSIÓN.....	54
10.	CONCLUSIONES.....	59
11.	RECOMENDACIONES.....	60
12.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61

ÍNDICE DE GRÁFICAS

	Página
Gráfica 1.- Diámetro de las hifas de <i>Saprolegnia spp</i>	49
Gráfica 1.- Prueba de Toxicidad	51
Gráfica 2.- Prueba de Efectividad.....	53

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1.- Principales componentes químicos del propóleo.....	13
Tabla 2.- Propiedades de las formulaciones de acuerdo a la vía de fabricación utilizada.....	19
Tabla 3.- Excipientes utilizados en la formulación del bolo	34
Tabla 4.- Distribución de los lotes en la prueba de toxicidad.....	37
Tabla 5.- Distribución de los lotes en la prueba de efectividad.....	38
Tabla 6.- Diámetro de las colonias de <i>Saprolegnia spp</i> en placa de 24 pozos usando propóleo de Toluca.....	42
Tabla 7.- Porcentaje de Inhibición de Crecimiento de <i>Saprolegnia spp</i> usando propóleo de Toluca.....	42
Tabla 8.- Diámetro de las colonias de <i>Saprolegnia spp</i> en placa de 24 pozos usando propóleo de Hidalgo.....	44
Tabla 9.- Porcentaje de Inhibición de Crecimiento de <i>Saprolegnia spp</i> usando propóleo de Hidalgo.....	44
Tabla 10.- Comparación en el diámetro de las hifas.....	49
Tabla 11.- Muertes registradas en la prueba de Toxicidad del bolo.....	50
Tabla 12.- Porcentaje de Mortalidad y Supervivencia en la prueba de Toxicidad del bolo.....	50
Tabla 13.- Muertes registradas en la prueba de Efectividad del bolo.....	52
Tabla 14.- Porcentaje de Reducción de la Mortalidad en la prueba de efectividad del bolo.....	52

2. ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1.- Estructuras de <i>Saprolegnia</i>	4
Figura 2.- Cultivo de <i>Saprolegnia spp</i> en agar PDA.....	5
Figura 3.- Ciclo reproductivo de <i>Saprolegnia</i>	7
Figura 4.- Corydora afectada por <i>Saprolegnia</i>	8
Figura 5.- Propóleo en trozos recolectado en la FESC.....	16
Figura 6.- Llenado de matriz de la prensa hidráulica marca Carver	22
Figura 7.- Prensa hidráulica marca Carver.....	23
Figura 8.- Comprimidos de Liberación modificada a base de Propóleo.....	35
Figura 9.- Pecera del lote Toluca	37
Figura 10.- Prueba de Inhibición del Crecimiento Radial usando propóleo de Toluca.....	39
Figura 11.- Prueba de Inhibición del Crecimiento Radial usando propóleo de Hidalgo.....	40
Figura 12.- Placa de 24 pozos en las primeras 86 horas con propóleo de Toluca.....	41
Figura 13.- Placa de 24 pozos en las primeras 86 horas con propóleo de Hidalgo.....	43
Figura 14.- Diferencias macroscópicas de <i>Saprolegnia spp</i> usando los bolos.....	45
Figura 15.- Pez (<i>Chirostoma</i>) con Saprolegnosis.....	46

Figura 16.- Control de *Saprolegnia spp* en comparación con *Saprolegnia spp* tratada con los Propóleo de Hidalgo y Toluca. Tinción Azul de algodón 40x.....47

Figura 17.- Control de *Saprolegnia spp* en comparación con *Saprolegnia spp* tratada con los Propóleo de Hidalgo y Toluca. Tinción Azul de algodón 20x..... 48

1. RESUMEN.

La Saprolegnosis es una enfermedad infecciosa producida por varios hongos, principalmente Oomicetos representantes del grupo de los saprolegniales. Las especies más frecuentemente halladas en los peces son: saprolegnia (*S. parasítica*, *S. diclina* y *S. ferax*, principalmente), *Achlya* y *Aphanomyces*. (Pasquel 2011).

Estos organismos son oportunistas viven en abundancia en el medio ambiente, y se alimentan de restos orgánicos en descomposición. La puerta de entrada para estos microorganismos es cutáneo-mucosa, e ingresan por lesiones macro o microscópicas relata.(Stevenson 1986).

La infección comienza cuándo las esporas del hongo alcanzan tejidos necróticos “muertos” en un individuo incapaz de hacer frente a estos hongos. De este modo se produce la colonización de los tejidos superficiales, principalmente la epidermis. Entonces la espora comienza a desarrollarse, formando el micelio compuesto por hifas que darán lugar a la formación de nuevas esporas, perpetuando el ciclo biológico del hongo (reproducción asexual).

En el presente trabajo se evaluó la eficacia de dos propóleos provenientes de Toluca e Hidalgo, contra *Saprolegnia spp* con la finalidad de proporcionar las bases para elaborar una alternativa terapéutica efectiva a base de propóleo.

Uno de los propósitos de este proyecto experimental, es la elaboración de un comprimido de liberación modificada utilizando al propóleo como principio activo y evaluando su eficacia antimicótica sobre la *Saprolegnia spp*, cepa obtenida de un caso clínico de Ajolote.

Se determinó cualitativamente que los extractos de propóleo utilizados causaron inhibición del crecimiento sobre *Saprolegnia spp*. Se obtuvo la concentración mínima inhibitoria (CMI), de los propóleos utilizados sobre la cepa de *Saprolegnia spp* por el método de dilución en agar en placa de 24 pozos, siendo de 0.25mg/ml. También se evaluó el daño celular de manera cualitativa sobre la cepa de *Saprolegnia spp* producido por los extractos de propóleo mediante microscopía óptica y análisis de imagen, en la evaluación se encontraron

alteraciones de tipo morfológico en las características de la pared celular de *Saprolegnia spp* tratado con los extractos de propóleo a diferencia de *Saprolegnia spp* sin tratamiento, en donde no se hallaron alteraciones.

Así mismo se desarrolló la formulación de un bolo de liberación modificada que posteriormente se puso en contacto con peces y con *Saprolegnia spp*. El bolo mostró resultados muy satisfactorios, en la prueba de toxicidad se consiguió un incremento en la supervivencia de los peces de 70% (Hidalgo), y 86.7% (Toluca), con respecto a los lotes que no tuvieron contacto con el bolo. En cuanto a la prueba de Eficacia el bolo evitó la infección que produce *Saprolegnia spp*, disminuyendo la tasa de mortalidad significativamente 73% (Toluca), y 53.07% (Hidalgo), de los peces tratados con el bolo con respecto a los que solo estuvieron en contacto con la cepa de *Saprolegnia spp*.

Estos resultados demuestran la efectividad del propóleo sobre *Saprolegnia spp* y proporciona un panorama muy alentador para la realización de futuros estudios en relación al tratamiento con propóleo en casos de infecciones micóticas en peces.

2. INTRODUCCIÓN.

2.1 SAPROLEGNIA.

El género *Saprolegnia* pertenece a la División *Oomycota*, *Saprolegnia* fue durante bastante tiempo considerado un hongo, pero hace poco se creó un nuevo reino, separándolo así del Reino Fungi e insertándolo en el nuevo reino, el Reino *Chromista*, el cual está mucho más cerca de las algas que de los hongos. Este Reino está representado además por las algas pardas y las diatomeas. La confusión que existía era debido a que *Saprolegnia* contiene características de los hongos como la presencia de hifas, y la constitución de micelio incluso creciendo en medios de cultivos para hongos. Aun así existen problemas con la clasificación de esta división, ya que internacionalmente existen muchos científicos que incluso la consideran en el Reino Protista. La importancia de trabajar con *Saprolegnia* es su condición de parásito en peces como la trucha y los salmónidos, siendo el causante de grandes pérdidas económicas, considerada así una molesta plaga para las empresas salmoneras. De hecho la importancia es tal que se han hecho estudios del genoma de *Saprolegnia* desde su ADN mitocondrial hasta la secuenciación de sus genes. (Bruno, D.W., and Wood, B.P. 1994).

2.1.1 Morfología y clasificación.

- *Saprolegnia* pertenece a la División *Oomycota*, división en la cual la mayoría de las especies son saprófitas o parasitoides. Las características comunes para sus especies son presentar zoosporos con flagelos barbulados y lisos, siendo el flagelo anterior barbulado y el posterior liso.
- *Saprolegnia* se encuentra en el orden Saprolegniales y pertenece finalmente a la Familia *Saprolegniaceae* la cual tiene como características generales un miceliocenocítico muy ramificado, una pared celular principalmente de glucanos, también de celulosa en la cual aparecen septos para separar los órganos reproductores.
- Los zoosporangios son largos y cilíndricos, terminales, de diámetro algo mayor que la hifa que los origina (Figura 1).

- El género *Saprolegnia* se presenta formando una estructura algodonosa (Figura 2), y un micelio poco organizado. En el micelio aparecen zoosporocistos que presentan un tabique, y en el interior se organizan multitud de zoosporas biflageladas que buscan activamente otro huésped.
- Las zoosporas se dividen en 2 tipos o zoosporas primarias: en forma de pera, flagelos apicales o zoosporas secundarias: reniformes, flagelos laterales dirigidos en sentidos opuestos, insertos en un surco lateral profundo.

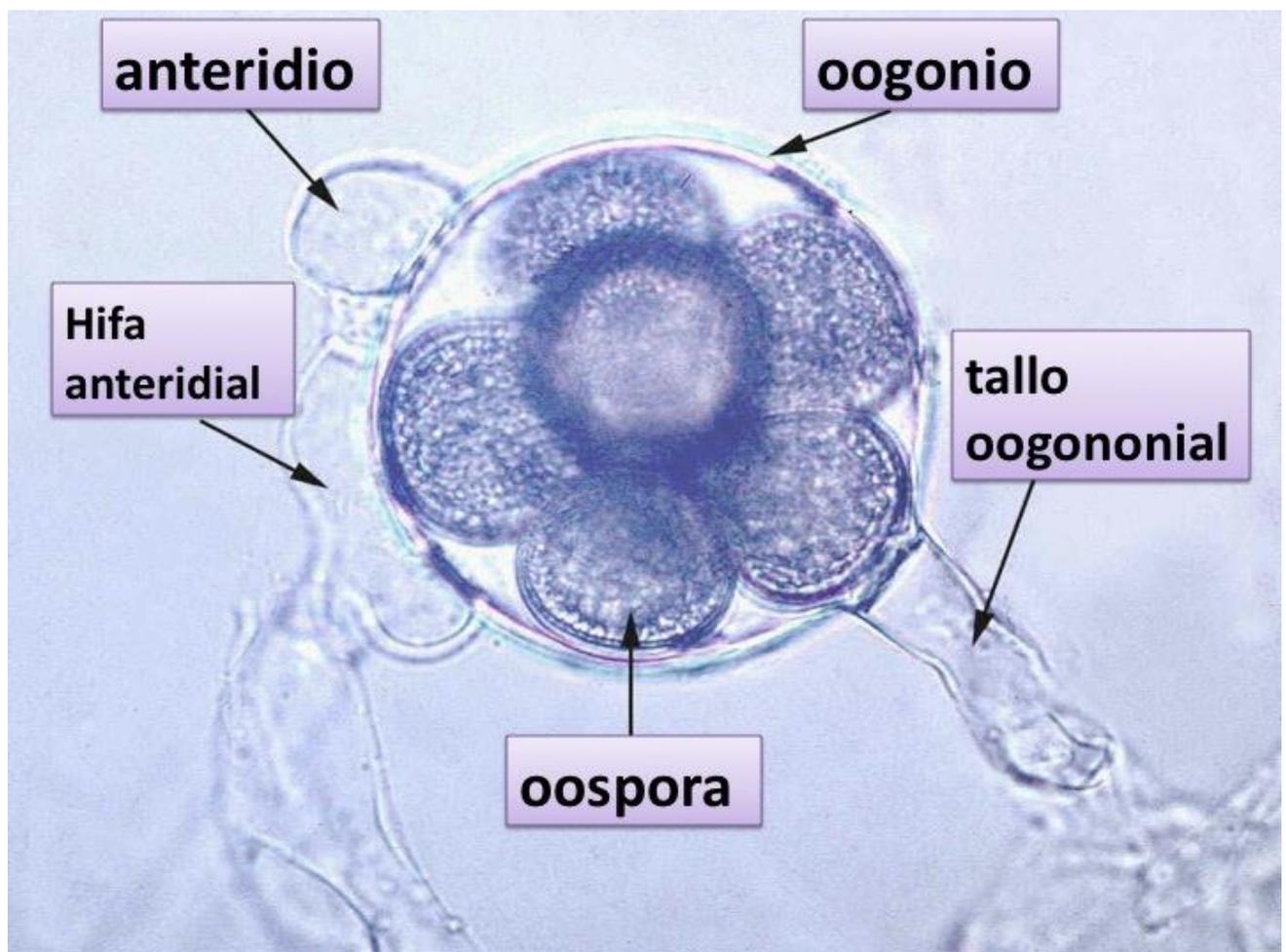


Figura 1.-Oogonio, oosporas y anteridio de *Saprolegnia parasitica* (Reproducción sexual)

<http://www.uoguelph.ca/~gbarron/MISC2006/saprol2.jpg>

Un número pequeño de *Saprolegnia parasitica* produce estructuras sexuales de identificación, después de prolongadas incubaciones y bajo ciertas condiciones de temperatura y nutrición. Para las cepas que no presentan sexualidad, se han adaptado técnicas moleculares como DNA “fingerprinting” o identificación por anticuerpos monoclonales contra esta especie (Whisler, 1996; Bullis y col., 1996; Bangyeekhun y col., 2001).



Figura 2.- Cultivo de *Saprolegnia spp.*, en Agar Dextrosa y Papa (Unidad de Investigación Multidisciplinaria, Laboratorio de Micología – Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán – UNAM).

2.1.2 Hábitat.

El género *Saprolegnia*, se encuentra principalmente distribuido en ambientes acuáticos, puede ser tanto saprófito como parasitoide, alimentándose así de células muertas o parasitando a peces como la trucha y el salmón, instalándose así en sus agallas. Este último caso es llamado micosis.

Saprolegnia es tolerante a grandes rangos de temperatura desde 3 a 33 °C, se encuentra preferentemente en el agua, aunque también puede habitar en suelo húmedo, Su rango de tolerancia a la sal (salinidad relativa) es de aproximadamente 1,75% de NaCl, no soportando así concentraciones iguales o superiores a 3,5% de NaCl. (Zaror., et. al. 2004).

2.1.3 Reproducción y comportamiento.

- *Saprolegnia* generalmente viaja en colonias consistentes de 1 o más especies. Ellas primero forman una masa de hifas. Cuando estas masas de hifas crecen lo suficiente se pueden ver a simple vista, el cual es llamado micelio. Las colonias son generalmente blancas, tornándose grises dependiendo de la presencia de bacterias u otros microorganismos.
- La reproducción en el género *Saprolegnia* esta caracterizada por un ciclo de vida diploide el cual incluye la reproducción sexual y asexual.
- En la fase asexual, se produce la diferenciación de esporangios en el extremo de las hifas somáticas. En los esporangios ocurre la llegada de núcleos migratorios los cuales son aislados por un septo, luego de esto se forman tantas zoosporas como núcleos; siendo así que las primeras serán liberadas por una abertura en el ápice.
- Una espora de *Saprolegnia* liberará una primaria zoospora. a los pocos minutos, esta zoospora se enquistará, germinará y liberará otra zoospora. Esta segunda zoospora tiene un largo ciclo durante el cual ocurre la mayor dispersión; esta continuara enquistada y liberara una nueva espora en un proceso llamado poliplanetismo hasta que ella encuentre un sustrato conveniente. Cuando un medio conveniente es encontrado, los pelos alrededor de la espora se sueltan sobre el sustrato comenzando así

la fase sexual. En esta fase es el momento en el cual *Saprolegnia* puede causar la infección; la especie más patógena tiene un pequeño gancho en la punta de sus pelos para incrementar su capacidad infecciosa. Una vez que esté firmemente atada, la reproducción sexual empieza con la producción de gametangios femeninos y masculinos, oogonio y anteridia respectivamente. Estas se unen y se fusionan a través de la vía de fertilización en tubos. El cigoto producido es llamado oospora. (Zaror., et. al. 2004).

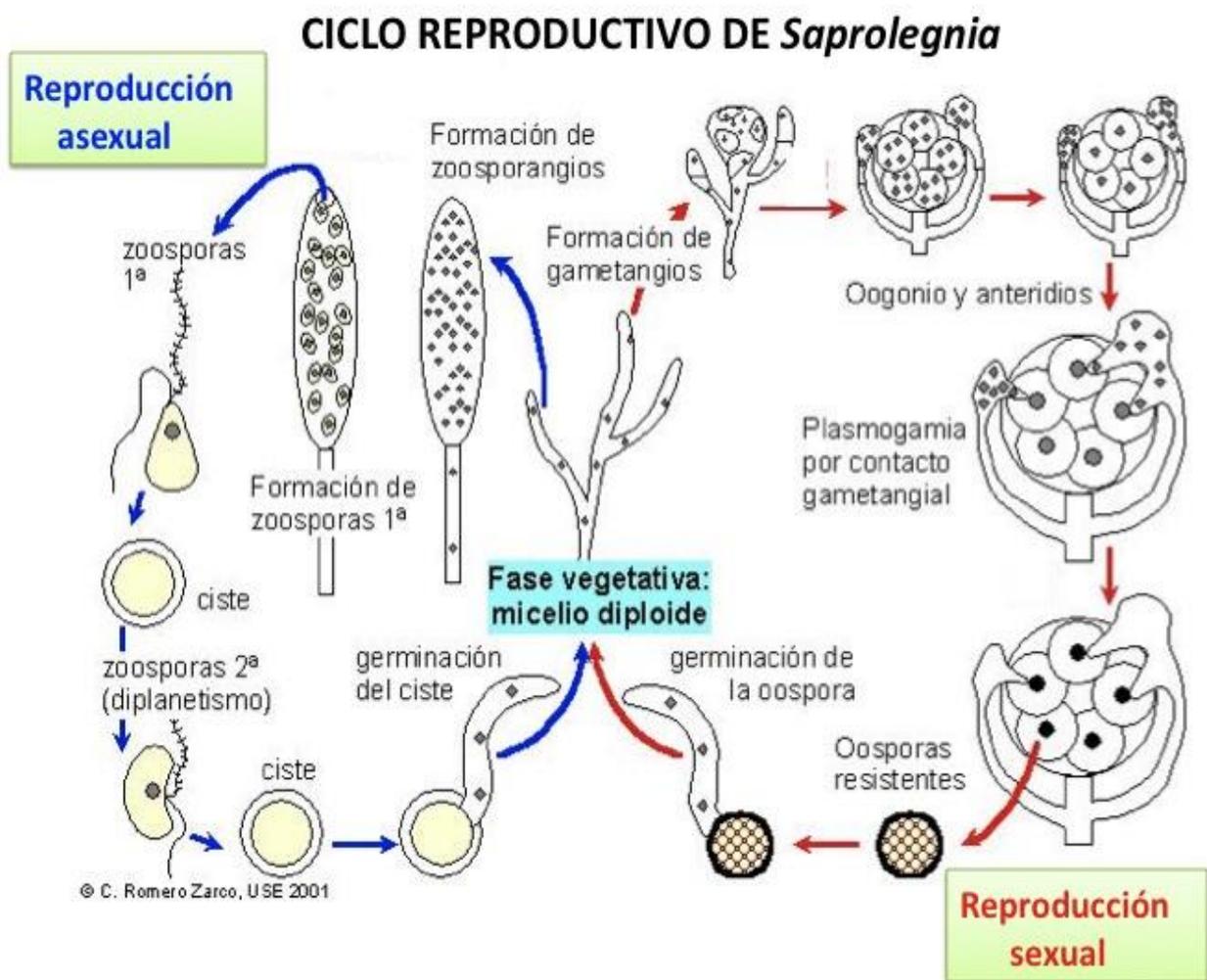


Figura 3.- Ciclo reproductivo de *Saprolegnia*. (Imagen obtenida de http://www.aloj.us.es/carromzar/Botanica_I/Temas_Botanica_I/T5_Ameboides.html)

2.2 SAPROLEGNOSIS.

La Saprolegniosis es una de las enfermedades que más afectan a peces de agua dulce, misma que es ocasionada por un hongo.

Los peces que padecen esta enfermedad presentan manchas compuestas por hilos grisáceos o blanquecinos sobre la superficie del cuerpo, por lo general sobre la cabeza, las aletas y las branquias. (Branson 2002).



Figura 4.- Corydora afectada por Saprolegnia (Imagen obtenida de <http://www.acuaristas.cl/phpbb/viewtopic.php?f=15&t=41395>)

2.2.1 Causas.

La infección es consecuencia de una inmunosupresión del pez probablemente provocada por una caída de temperatura en el agua. Esta produce una reducción en la secreción de mucus y una baja en la formación de anticuerpos. Por otra parte un aumento de la temperatura en el agua a los peces de agua fría, también los afecta ya que acelera el proceso de multiplicación de los hongos. (Bruno & Wood 1994).

Heridas en la epidermis, donde se pierde el mucus protector, es otro factor y puede deberse a que el pez se lastime con alguna superficie cortante como por ejemplo piedras puntiagudas, alguna pelea entre especies no compatibles, etc. En ciertos peces se puede observar una ligera irritación y luego de unas 24 hrs. aparecen zonas algodonosas en las áreas lastimadas.

El estrés causa un exceso de corticosteroides en la sangre lo que ocasiona una deficiencia proteica y esta a la vez no permite la producción de anticuerpos y mucus. De igual manera el exceso de materia orgánica en el acuario es una condición de inmunosupresión.

2.2.2 Patogenia.

Una vez que las esporas se posan en un punto de la piel, germinan y atraviesan la epidermis, llegando a la dermis donde se desarrolla el micelio del hongo. Al parecer las hifas del hongo segregan alguna toxina ya que se observan gran cantidad de células muertas “necrosis” alrededor de ellas. A partir de ahí se extiende por toda la dermis colonizando todo el cuerpo del pez. Esto produce un desequilibrio osmótico con pérdida de electrolitos y le impide mantener el volumen de sangre circulante. El pez muere por fallo circulatorio. (Alderman 1994).

En ciertos casos se han detectado invasión de las hifas hacia músculos y órganos internos. En los casos en los que el hongo coloniza las branquias, al fallo circulatorio se le suma una insuficiencia respiratoria. Como principales alteraciones histopatológicas se observa la pérdida de epitelio y desórdenes del sistema circulatorio, consistentes en coagulación sanguínea con hemorragias

ocasionales. Los peces infectados desarrollan lesiones focales en las que el hongo invade el *stratum spongiosum* de la dermis y se extiende lateralmente a la epidermis, produciendo alteraciones a este nivel. (Zaror 2004).

Este hongo también se detecta en los huevos estériles que son rápidamente colonizados, al estar estos en estrecho contacto también afecta a los huevos fértiles, es por eso que algunas especies de peces separan a los que están infértiles. En el caso de que la puesta se separe de los padres, habrá que medicar como método preventivo todo el conjunto y separar los que no estén fecundados.

2.2.3 Tratamiento.

Saprolegnia no sobrevive en ambientes con alta concentración de sal, por lo tanto, la saprolegniosis no ocurre durante la fase marina ni estuarina, en la migración de salmónidos, considerándose una enfermedad de agua dulce (Padgett, 1984). Sin embargo, Langvad en 1994 reportó que *Saprolegniaparasitica* podría sobrevivir y crecer en ambientes con una salinidad relativa de aproximadamente 1.75% de NaCl. No se observó desarrollo en concentraciones iguales o superiores a 3.5% de NaCl.

La infección por *Saprolegnia* es fácilmente controlada por la aplicación de Verde Malaquita, un colorante que puede ser aplicado sólo o en combinación con otros fungicidas. Este colorante ha sido prohibido en gran parte de los países productores, ya que se le ha atribuido propiedades teratogénicas, volviendo *Saprolegnia* a ser un problema de importancia económica en las pisciculturas (Alderman, 1994).

Las enfermedades micóticas producen grandes pérdidas económicas en acuicultura. En Japón, la mortalidad anual ha llegado a sobrepasar el 50% en Salmón coho, debido a *Saprolegniaparasitica* (Bruno y Wood, 1999).

2.3 PROPÓLEO.

El término propóleo o própolis deriva del griego “*pro*” que significa en defensa de; y “*polis*” que significa ciudad o colmena (Peña; 2008), haciendo referencia al uso que le dan las abejas al colocarlo en los accesos a la colmena (Gutiérrez; 2011).

El propóleo es el nombre genérico que se le da a la resina cética de composición compleja y consistencia viscosa, que las abejas elaboran a partir de partículas resinosas de diferentes vegetales y que utilizan en la construcción, reparación y protección de la colmena, disminuyendo así la entrada del viento, lluvia y frío, también lo emplean para reducir el tamaño de la entrada a la colmena, para cerrar grietas o para embalsamar pequeños animales muertos dentro de la misma, los cuales las abejas no pueden sacar debido a su tamaño y peso (Peña; 2008). El propóleo es también responsable de la sanidad de los panales, en especial contra microorganismos (Estrada; 2012).

Las abejas son los intermediarios entre las plantas y los propóleos. Su recolección responde a un patrón de forrajeo, donde las abejas pecoreadoras extraen el propóleo de las yemas valiéndose de sus mandíbulas y del primer par de patas que poseen, durante este proceso la secreción del ácido 10-hidroxidecenoico por las glándulas mandibulares permiten el ablandamiento y trituración del propóleo para facilitar su transporte en los cestillos de polen de las patas traseras. Al ingresar a la colmena, se dirigen inmediatamente al lugar donde éste es requerido y permanecen quietas, dejando que las abejas propolizadoras, tomen algunas partículas de la sustancia, para comprimirla, agregarle cera y proceder al propolizado. Las abejas son indispensables para la formación de los propóleos, ya que algunos compuestos químicos de origen vegetal son modificados químicamente por las enzimas presentes en su saliva (Navarro, Hernández y Velazquez; 2011).

Los propóleos son una mezcla diversa de compuestos químicos que le confieren una consistencia resinosa, aromática y pegajosa. Su color es variable, verde, amarillo-verdoso, rojo o café oscuro, dependiendo de sus constituyentes y su madurez. Es insoluble en agua y soluble en alcohol. A temperaturas de

congelación se cristaliza y a altas temperaturas toma una consistencia chiclosa (Navarro, Hernández y Velazquez; 2011).

2.3.1 Composición química.

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

La composición química del propóleo es compleja y depende de varios factores como son: la región geográfica, el clima, el relieve la vegetación natural y las cuencas hidrográficas entre otros. La vegetación que rodea a la colmena es de importante consideración ya que es a la que recurren las abejas. Algunos ejemplos de éstas fuentes vegetales son: el pino, abeto, sauce, abedul, varias especies de álamo, fresno, roble, entre muchos otros que encuentren cerca de sus colmenas. Es por estos que los propóleos de diferentes zonas geográficas poseen efectos similares pero difieren en su composición. (López 2012).

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

Componentes químicos del propóleo.

COMPONENTES	EJEMPLOS
Ácidos orgánicos	Ácido benzóico C_6H_5-COOH gálico. $C_7H_6O_5$
Ácidos fenólicos	Ácidos cafeico $C_9H_8O_4$, cinámico, pumarínico, insofenílico y fenólico
Aldehidos aromáticos	Vainillina $C_8H_8O_3$, isovainillina $C_8H_8O_3$
Cumarinas	Esculetol, escopuletol
Flavonoides	Pinocembrina $C_{15}H_{12}O_4$, galangin $C_{15}H_{10}O_5$, pinobanksina $C_{15}H_{12}O_5$
Flavonas	Acacetina $C_{16}H_{12}O_5$, cresina amarilla, pectolinaringenina $C_{17}H_{14}O_6$, tectocrisina $C_{16}H_{12}O_4$
Flavonoles	Izalquinina, kaempférido $C_{16}H_{12}O_6$, quercetina $C_{15}H_{10}O_7$, remnocitrina.
Flavononas	Pinostrobina $C_{16}H_{14}O_4$, sakuranetina $C_{16}H_{14}O_5$.
Flavonoles	Pinobanksina, ferúlico, los sesquiterpenos y las flavononas (principalmente las galanginas $C_{15}H_{10}O_5$)
Minerales	Aluminio, plata, bario, boro, cromo, cobalto, cobre, estaño, hierro, magnesio, manganeso, molibdeno, níquel, plomo, silicio, estroncio, titanio, vanadio, zinc
Vitaminas	Provitamina A y vitamina B3

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

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

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

2.3.1 Actividad antimicrobiana.

El propóleo ha sido utilizado especialmente por sus propiedades antimicrobianas, aunque éste posee otras cualidades terapéuticas. Está documentada la actividad del propóleo contra bacterias, hongos, protozoarios, virus y parásitos, así como actividad cicatrizante y regenerador de tejidos, antiinflamatorias, antioxidante, analgésica, hepatoprotectora, entre otras.

a) Mecanismos de acción antimicrobiana del propóleo.

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

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

bacteriolisis parcial acompañado de inhibición en la síntesis de proteínas (Gutiérrez; 2011).

En lo que se refiere a la galangina se sabe que provoca un incremento considerable en la pérdida de potasio lo cual se atribuye al daño ocasionado directamente en la membrana citoplasmática o bien, podría llevarse a cabo un daño indirecto por un debilitamiento de la pared celular y una lisis como consecuencia de un choque osmótico. Se ha determinado que la quercetina inhibe la ADN girasa de manera parcial (Gutiérrez; 2011).

El propóleo es el producto de abeja con la mayor actividad microbiana, la cual ha sido confirmada por numerosos estudios científicos, se ha demostrado su actividad en contra de múltiples microorganismos tales como: *Bacillus cereus*, *Mycobacterium sp.*, *Streptococcus: S. Epidermis*, *S. Faecalis*, *S. Mutans*, *S. Viridans*, *E. Coli*, *Helicobacter pylori*, *Aspergillus sp*, *Cryptococcus neoformans*, *Proteus vulgaris*. Entre otros (Estrada 2012).

2.3.2. Efecto antimicótico del propóleo.

Las propiedades antimicóticas del propóleo han sido estudiadas por numerosos investigadores, quienes aseveran que tal actividad depende tanto del origen del propóleo así como del solvente utilizado para su extracción. Se han identificado compuestos como: pinocembrina, galangina, ácido benzoico, ácido salicílico, vainillina, mono y sesquiterpenos, los cuales son responsables de sus propiedades fungicidas (Estrada; 2012).

2.3.3 Propóleos mexicanos.

A diferencia de otros países como, Argentina, Brasil, Honduras, China y Turquía entre otros, en México no se han estudiado a profundidad el origen botánico o químico de nuestros propóleos .

El objetivo del presente trabajo no es profundizar en las características de cada uno de los propóleos mexicanos, sin embargo vale la pena mencionar que recientemente se han analizado distintos propóleos provenientes de distintos estados de la república, para llevar a cabo su caracterización (Estrada; 2012).



Figura 5.- Propóleo en trozos recolectado en la FESC(Taller de Mieles – Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán – UNAM).

2.4 COMPRIMIDOS .

Antecedentes.

La preparación de los primeros comprimidos se le atribuye a William Brockedon, en 1843, de bicarbonato de potasio y se considera que fueron resultados del impulso que experimentó la mecánica de la compresión con la introducción del prensado de grafito en la fabricación de minas de lápices.

El procedimiento de compresión de polvos en la tecnología farmacéutica fue introducido como tal, en ese mismo año, como patente de Brockedon para la producción de píldoras, pastillas y minas de lápices por presión en matrices: así, las primeras patentes para máquinas de comprimir datan de los años 1874 - 1876 .

Las farmacopeas por su parte incluyen esta forma farmacéutica hasta 1916 cuando la USP IX reconoce oficialmente el primer comprimido, a partir de entonces, diferentes farmacopeas comienzan a introducir progresivamente diversas monografías sobre comprimidos lo que pone de manifiesto el interés creciente de esta forma de dosificación. Así, la farmacopea británica incluye su edición de 1932 una única monografía de comprimidos (trinitrato de glicerilo), mientras que en la edición de 1988 figuran 276 monografías de esta forma farmacéutica. En 1930, la VIII edición de la farmacopea española incluye por primera vez un capítulo monográfico sobre comprimidos, presentando una lista de 10 principios activos incorporados a esta forma de dosificación.

2.4.1 Definición.

Un comprimido o tableta es una forma farmacéutica sólida de dosificación unitaria que contiene principios activos, con o sin excipientes cuyo método de fabricación es por compresión (Magaña, B.; 2001).

2.5 VÍAS DE FABRICACIÓN DE COMPRIMIDOS.

La importancia del proceso tecnológico en la elaboración de comprimidos, hace que estos puedan clasificarse según el método de obtención en:

1.- Comprimidos obtenidos por compresión directa del fármaco o de una mezcla de fármaco con excipientes.

a. Compresión directa.

2.- Comprimidos obtenidos por compresión de un granulado.

a. Granulación seca.

b. Granulación húmeda.

2.5.1 Características de las formulaciones para la compresión de acuerdo a la vía de fabricación.

PROPIEDAD.	GRANULACIÓN VÍA HÚMEDA.	GRANULACIÓN VÍA SECA.	COMPRESIÓN DIRECTA.
COMPRESIBILIDAD.	Tabletas más duras para sustancias pobremente compresibles.	Las presiones requeridas para la cohesión pueden producir durezas altas	Problema potencial para fármacos en alta dosis.
FLUIDEZ.	Excelente en la mayoría de los casos.	Bueno en la mayoría de los casos, aunque se genera gran cantidad de finos.	Muchas formulaciones requieren de un deslizante. No micronizar fármacos cuando van en altas dosis.
TAMAÑO DE PARTÍCULA.	Más grandes con intervalos mayores.	Pequeñas con intervalos estrechos.	Más pequeñas con intervalos estrechos.
UNIFORMIDAD DE CONTENIDO.	Inducida por amasado y secado.	Puede ocurrir segregación en el transporte entre la tolva y el alimentador.	Puede ocurrir segregación en el transporte entre la tolva y el alimentador.
MEZCLADO.	Alto o bajo corte.	Alto o bajo corte.	Bajo corte con mezcla ordenada.
LUBRICANTE.	Menos sensible a la suavización por el lubricante y al sobremezclado.		Mezclado mínimo con estearato de magnesio.
DESINTEGRACIÓN.	Problemas frecuentes con los gránulos.	La compactación de sólidos puede generar problemas.	Generalmente bueno.
DISOLUCIÓN.	1.- Fármaco humectado durante el proceso. 2.- La disolución del fármaco desde los gránulos puede ser un problema. 3.- Generalmente es menor que la compresión directa.	1.- No humectación, puede ser necesario un agente tensoactivo. 2.- Las presiones excesivas requeridas para la precompresión prolongan el tiempo de disolución.	3.- No humectación puede ser necesario un agente tensoactivo. 4.- La disolución puede ser menor si se usan cristales de fármaco muy grandes. 5.- Generalmente más rápida que en la granulación húmeda.
COSTOS.	Aumenta en equipo, trabajo, tiempo, validación del proceso y limpieza, y energía.	Requiere de equipo de precompresión.	Aumenta en materias primas y su control de calidad.
FLEXIBILIDAD DE FORMULACIÓN.	La granulación cubre las imperfecciones de las materias primas.	La precompresión mejora las propiedades reológicas.	Las propiedades de las materias primas deben ser cuidadosamente definidas.
ESTABILIDAD DEL FÁRMACO.	1.- Problemas con fármacos hidrolábiles o tremolables. 2.- La velocidad de disolución puede disminuir con el tiempo.	1.- Problemas con fármacos presentes en alta cantidad.	2.- No se requiere calor o humedad. 3.- La velocidad de disolución raramente cambia. 4.- problemas con fármacos que presentan amorfisidad.

Tabla 2.- Propiedades de las formulaciones de acuerdo a la vía de fabricación utilizada (Magaña, B.; 2001).

En la actualidad la industria farmacéutica está enfocada en la obtención de tabletas a través de procesos que generen menor costo y tiempo de fabricación; siendo el proceso de compresión directa el que puede otorgar estos beneficios (Hernández, M. E; 2002).

2.6 COMPRESIÓN DIRECTA.

Hasta finales de los 50's la gran mayoría de las tabletas producidas en el mundo eran fabricadas mediante un proceso que requería la granulación de los ingredientes en polvo antes del tableado. El propósito principal de la etapa de granulación es producir una mezcla de activos y excipientes con un flujo libre que sea compresible (Alvarez, G; 2003).

La compresión directa surge como una necesidad de reducir las etapas requeridas para elaborar un medicamento en tabletas. Para ello hubo que desarrollar tecnología (máquinas tableadoras, mezcladores diferentes a los existentes hasta entonces), así como excipientes con características especiales que facilitaran la compresión directa del fármaco (Alvarez, G; 2003).

A pesar de las aparentes grandes ventajas que trae este proceso en la manufactura de tabletas, aun no se ha adoptado como la técnica universal de fabricación de formas farmacéuticas sólidas.

La compresión directa inicialmente fue definida para polvos o cristales que se comprimían directamente sin la adición de ningún otro aditivo; sin embargo pocas sustancias químicas poseen las propiedades de flujo, lubricación y cohesión bajo presión para hacer posibles dichos compactos. Además, la dosis efectiva de la mayoría de los activos es tan pequeñas que este tipo de compresión no es práctica (Alvarez, G; 2003).

Actualmente, el término es usado para definir el proceso por el cual las tabletas son manufacturadas a partir de la compresión directa de mezclas de polvos, las cuales contienen al principio activo y excipientes adecuados (diluentes, aglutinantes, lubricantes, desintegrantes, etc). (Hernández, M. E; 2002). Esta mezcla debe fluir libremente hacia la matriz donde va a ser comprimida, debe

tener suficientes propiedades cohesivas para formar tabletas fuertes y resistentes, propiedades lubricantes para prevenir que se pegue a los punzones y matrices, uniformidad de la dosis de principio activo en cada tableta, entrega satisfactoria del principio activo después de la administración y capacidad de ser procesada a altas velocidades de producción.

La adopción de este proceso se hizo posible por la disponibilidad comercial de excipientes que poseían tanto fluidez como compresibilidad el primero fue la lactosa spray-dried, que inició la “revolución de la compresión directa” posteriormente fueron introducidos otros excipientes como la celulosa microcristalina, el primer diluyente-aglutinante en seco, Avicel ®; Starch 1500®, un almidón parcialmente gelatinizado que posee un alto grado de fluidez y compresibilidad, manteniendo sus propiedades desintegrantes; Emcompress®, un fosfato dicálcico compresible de libre flujo; azúcares compresibles como Nutzb®, Di-pac®, Emdex®, entre otros. Cada vez se van mejorando los excipientes proporcionando mayor variedad de los mismos. Al mismo tiempo, se ha tenido mayores avances en las tableteadoras, tales como el alimentador positivo y las etapas de precompresión que facilitan al tableteo por compresión directa.

A pesar de que puede ser un proceso aparentemente sencillo la compresión directa no debe ser concebida como una simple modificación del proceso de granulación, ya que requiere un análisis minucioso sobre diversos aspectos importantes: la selección de los excipientes, las propiedades de flujo de las mezclas de polvos, y los efectos de la formulación que influyen sobre la compresibilidad.

Es importante conocer entonces como se lleva a cabo el proceso de compresión para comprender que otras características del activo y los excipientes pueden afectar la compresión.

2.6.1 Etapas del proceso de compresión.

- **Llenado.** En esta etapa las partículas son introducidas en la cavidad de la matriz desde la tolva sin cubrir aún los espacios entre las partículas.



Figura 6.- Llenado de matriz de la prensa hidráulica marca Carver (Unidad de Investigación Multidisciplinaria, Laboratorio De Ensayos de Desarrollo Farmacéutico – Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán – UNAM).

- **Rearreglo.** En esta etapa inicial de la compresión de las partículas se mueven dentro de la cavidad de la matriz para ocupar los espacios se mueven dentro de la cavidad de la matriz para ocupar los espacios vacíos que existen entre las partículas (Amador, E; 1995).
- **Deformación elástica.** Es una deformación reversible del compacto, en el cual después de remover la fuerza, la masa de polvos se revierte a su forma original, es decir, que se recuperan espontáneamente. Al final de estas etapas comienza una deformación irreversible (Amador, E; 1995).

- **Compactación (formación de enlaces).** Después de exceder el límite elástico del material, la deformación que se presenta puede ser plástica o irreversible (fragmentación o fractura frágil). Cualquiera de los 2 mecanismos puede ocurrir y es dependiente de las características del material, de la velocidad y presión de la compactación así como del tamaño de partícula. La deformación plástica ayudará al enlazamiento ya que incrementa el área de contacto entre las partículas, y la fragmentación produce nuevas superficies las cuales favorecen la unión fuerte (Amador, E; 1995).



Figura 7.- Prensa hidráulica marca Carver, utilizada para comprimir (Unidad de Investigación Multidisciplinaria, Laboratorio De Ensayos de Desarrollo Farmacéutico – Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán – UNAM).

- **Reposo o relajación (eyección).** Una vez que la fuerza de compresión cesa (durante el retiro del punzón y eyección de la tableta de la cavidad de la matriz) el compacto experimenta relajación, si estas fuerzas elásticas exceden la fuerza de tensión de la tableta, entonces la integridad de la tableta no se mantendrá (Amador, E; 1995).

Una vez que conocemos como se lleva a cabo el proceso de compresión, el entendimiento del comportamiento de las partículas bajo este proceso es entonces la clave para comprender la formación y las propiedades de las tabletas, los 3 principales procesos de deformación son:

- **Deformación elástica.** Es una deformación reversible del compacto, en el cual después de remover la fuerza, la masa de polvos se revierte a su forma original, es decir, que se recuperan espontáneamente. La mayoría de los materiales se someten a una deformación elástica.
- **Deformación plástica.** Después de exceder el límite elástico del material, la deformación se convierte en plástica, esto es, que las partículas se someten a un flujo viscoso. La deformación plástica, es un proceso dependiente del tiempo.
- **Fragmentación.** Al exceder el límite elástico del material, las partículas sufren fractura. Bajo estas condiciones, las partículas son cortadas y fracturadas a partículas más pequeñas.

2.7 LIBERACIÓN MODIFICADA.

En los años recientes la salud animal se ha convertido en un área de gran interés para el Farmacéutico por razones económicas, de investigación y de zoonosis (Banker; 2002).

En Estados Unidos desde los años 60's, en las universidades de Farmacia se comenzaron a ofrecer cursos de Farmacia Agrícola, Terapéutica Veterinaria e Investigación de Productos Veterinarios y a la fecha en varios colegios de Estados Unidos cuyas ventas representan casi un tercio del total de las ventas en la industria de la Salud animal, están localizados en campos agrícolas concedidos a éstas universidades en sus estados respectivos (Banker; 2002).

Actualmente la tecnología de liberación modificada de fármacos juega un importante papel en el desarrollo de la industria farmacéutica en salud animal y existen numerosos ejemplos de innovadores sistemas de liberación modificada de fármacos (Ahmed y Kasraian; 2002).

Algunos de los medicamentos veterinarios son de liberación controlada e incluyen pesticidas, vacunas, hormonas del crecimiento y reproducción, parasiticidas, antibióticos y suplementos nutricionales (Mathiowitz; 1999).

En este trabajo se pretende mostrar la importancia del área de la salud animal, como un área de gran interés no solo por las razones antes mencionadas sino como un campo de trabajo en el que el Farmacéutico puede incursionar, pues por razones de anatomía y fisiología se pueden desarrollar novedosos y únicos sistemas de liberación de fármacos.

2.7.1 Definición.

De acuerdo con la Real Farmacopea Española, las formas farmacéuticas de liberación modificada son aquellas en las que la velocidad y el lugar de liberación de la sustancia o sustancias activas es diferente al de la forma farmacéutica de liberación convencional, administrada por la misma vía (Real Farmacopea Española 2005).

2.7.2 Clasificación.

Existen numerosas clasificaciones basadas en la forma de liberar el fármaco o bien en los mecanismos que gobiernan dicha liberación. La siguiente clasificación pretende ser lo más sencilla posible, de acuerdo con lo que aparece en la mayoría de los tratados de tecnología farmacéutica (Lastres;2002).

- Sistemas de Liberación acelerada: Formas orales liofilizadas.
- Sistemas de liberación diferida: Sistemas de cubierta entérica, gastrorresistentes y de liberación pulsátil o secuencial.
- Sistemas de liberación prolongada: comprimidos y parches matriciales.
- Sistemas flotantes o bioadhesivos.

3. OBJETIVOS.

Objetivo General.

Analizar la actividad *In Vitro* e *In vivo* de propóleos provenientes de los estados de Toluca e Hidalgo en una cepa de *Saprolegnia spp.*

Objetivos particulares.

Determinar el efecto que ocasiona el propóleo sobre cepas de *Saprolegnia spp.*, mediante la observación de la morfología macroscópica y microscópica.

Determinar cualitativamente la inhibición causada por los propóleos de Toluca e Hidalgo sobre *Saprolegnia spp.* mediante prueba de inhibición del crecimiento radial.

Obtener la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del ambos propóleos sobre *Saprolegnia spp.* por el método de dilución en placa de 24 pozos.

Desarrollar un comprimido de liberación modificada que tenga como principio activo propóleo para peceras y analizar su eficacia sobre *Saprolegnia spp.*

Sugerir un tratamiento preventivo de saprolegnosis en peceras.

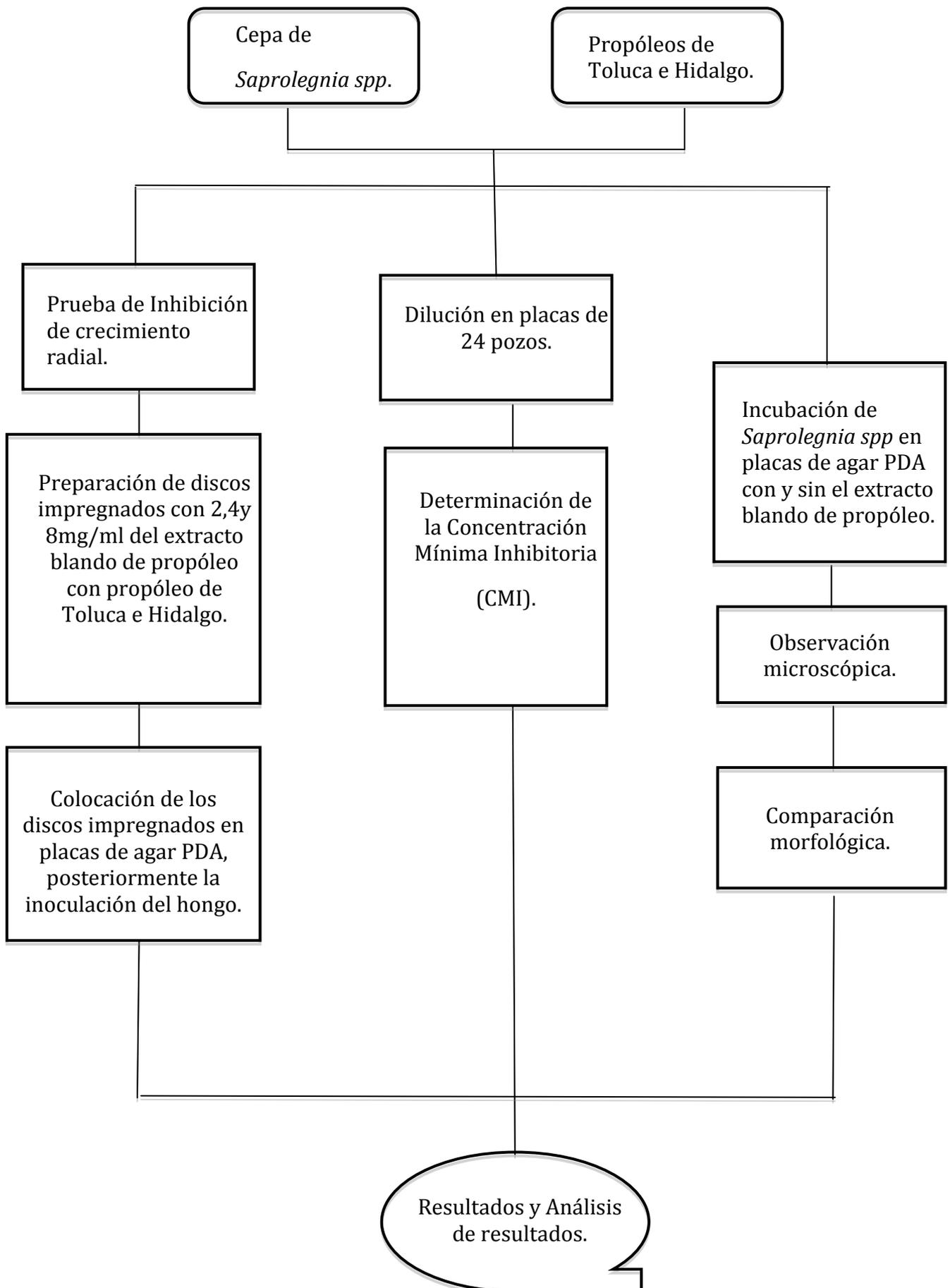
4.- HIPÓTESIS.

Si el extracto de propóleo de los estados de Hidalgo y Toluca tienen actividad inhibitoria del crecimiento de microorganismos, por lo tanto deberá inhibir el crecimiento de *Saprolegnia spp* y al ser el propóleo el principio activo del bolo desarrollado, éste deberá evitar la infección y por lo tanto la muerte de los peces (*Chirostoma*) tratados con el mencionado bolo.

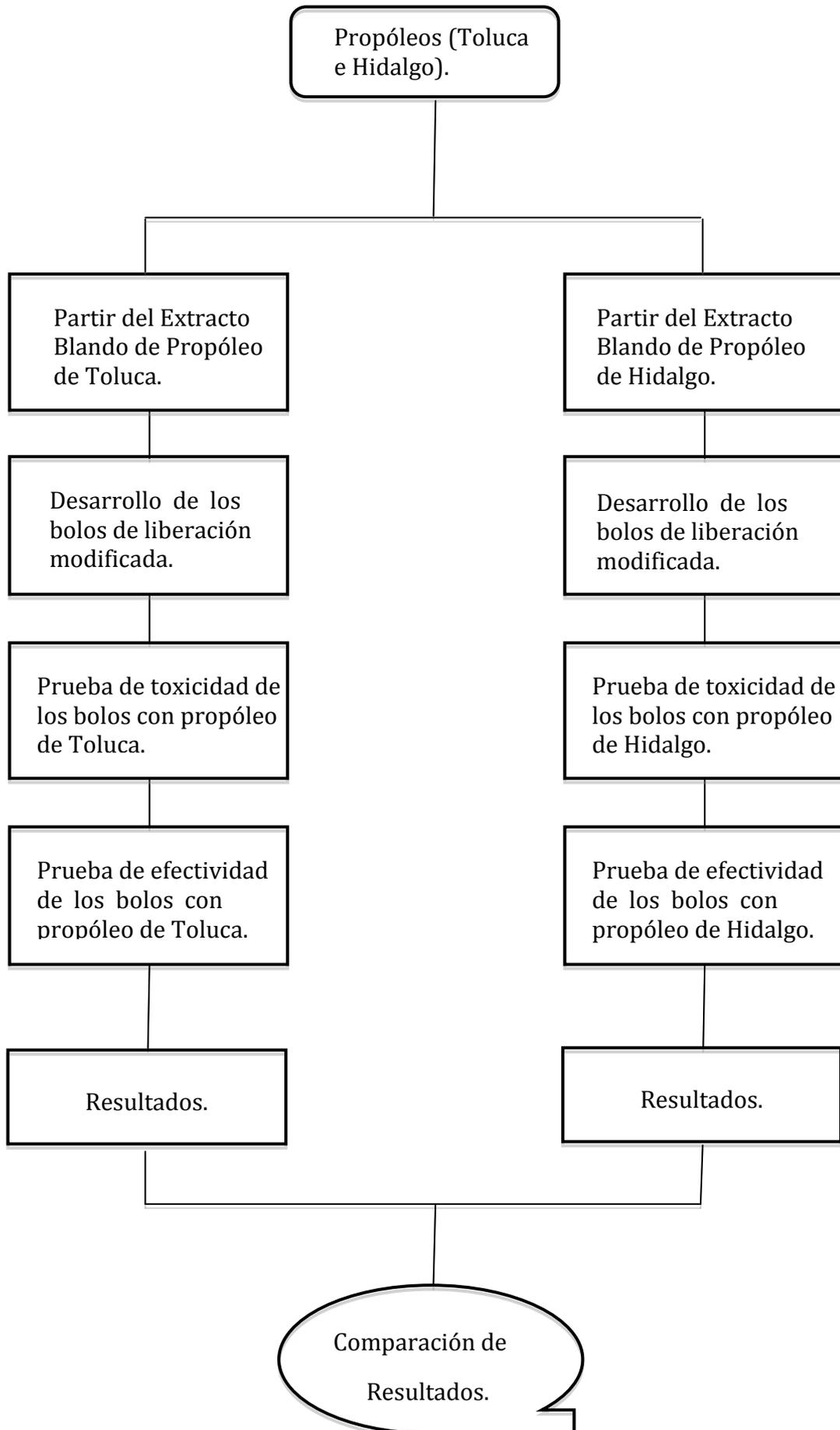
5.- JUSTIFICACIÓN.

El presente trabajo está pensado en disminuir la infección ocasionada por *Saprolegnia spp* en peces como el Salmón (*Salmo Salar*) y la trucha(*Oncorhynchus mykiss*) pues la saprolegnosis ocasiona pérdidas millonarias en la acuicultura, sin embargo la principal razón es evitar la infección en el Ajolote mexicano (*Ambystoma mexicanum*), pues esta especie que actualmente se encuentra en peligro de extinción es sumamente susceptible a la infección por *Saprolegnia spp*,

6. DISEÑO EXPERIMENTAL. (PRIMERA PARTE)



(SEGUNDA PARTE)



7. MATERIALES Y MÉTODOS.

PRUEBAS *in vitro*.

7.1 PRUEBA DE INHIBICIÓN DE CRECIMIENTO RADIAL (Método modificado de Wang y Bunny 2002).

Se sembró la cepa de *Saprolegnia spp* en medio de cultivos de Agar Dextrosa-Papa (ADP, DIBICO), llevando a una temperatura de incubación de 25°C durante 7 días hasta que se observó el desarrollo colonial de este dermatofito. Posteriormente se colocó en el centro de una caja Petri (100x15), que contiene 20 ml de ADP, un inóculo de 5 mm de diámetro de *Saprolegnia spp*, una vez realizado se procedió a colocar alrededor del inóculo discos impregnados con el extracto de propóleo a diferentes concentraciones (2, 4 y 8mg/ml), y discos de Ketoconazol (BIORAD), como controles, a una distancia de 30 mm del límite micelial, Las placas se llevaron a incubación a 25°C hasta que la superficie del agar estuvo cubierta por el micelio.

7.2 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) POR EL MÉTODO DE DILUCIÓN EN PLACA DE 24 POZOS (Modificado de Ye et al, 1999).

En primera instancia se procedió a la preparación de una solución patrón de extracto de propóleo al 3%, a la cual se le realizaron 7 diluciones respectivamente: 3.0, 2.5, 2.0, 1.5, 1.0, 0.50, 0.25mg/ml. Para su realización se emplearon placas de 24 pozos, adicionando a cada pozo 1 ml de medio con cada de una de las concentraciones del extracto descritas, por triplicado. Una vez listo se colocó en el centro de cada pozo un fragmento del cultivo de *Saprolegnia spp* de 1mm de diámetro, empleando como control negativo el medio sin extracto. Posteriormente la placa fue llevada a una temperatura de incubación de 25°C hasta observar que el control presentara desarrollo y a su vez, se midió el área del crecimiento micelial para así determinar la concentración mínima inhibitoria.

7.3. COMPARACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE *Saprolegnia spp.*

Para la realización de esta prueba se dividieron 30 peces (*Chirostoma*) en 3 lotes, el lote blanco se infectó con *Saprolegnia spp*; el lote Toluca, se infectó con *Saprolegnia spp* y estuvo en contacto con el bolo a base de propóleo de Toluca; el lote hidalgo, se infectó con *Saprolegnia spp* y estuvo en contacto con el bolo a base de propóleo de Hidalgo, se mantuvieron en las mismas condiciones de temperatura y alimentación posteriormente se tomó un pez muerto de cada pecera (los peces seleccionados murieron el mismo día), se colocaron en cajas de Petri con Agar Dextrosa y Papa, a una temperatura de 25°C, con la finalidad de que creciera la cepa de *Saprolegnia spp*, una vez que se tuvieron las 3 cepas, se tomaron muestras de cada una, a las cuales se les realizó una tinción de azul de algodón y se realizaron las observaciones tanto macroscópicas como microscópicas de los 3 lotes.

7.4. ELABORACIÓN DEL COMPRIMIDO DE LIBERACIÓN MODIFICADA.

Para el desarrollo del bolo se tuvieron en consideración muchos factores, primeramente se trataba de un bolo que debía alcanzar una concentración de propóleo en el agua que inhibiera el crecimiento de *Saprolegnia spp*, sin que fuese tóxico para los peces, y que la liberación del principio activo fuera lenta, para evitar la irritación en las branquias de *Chirostoma* y su muerte; también fue necesario contemplar que el bolo no podía ser de rápida disolución pues los restos de excipientes que no fuesen solubles en agua podrían ocasionar turbidez en el agua y daño a los peces.

Debido a que se pretendía evitar la proliferación del hongo en el agua el bolo debía estar en las peceras como tratamiento diario y que la concentración de propóleo siguiera en el agua aun después de los cambios rutinarios de la misma.

Para conseguir las características anteriores, se probaron diferentes tipos de materiales que fuesen hidrofóbicos con la finalidad de prolongar el tiempo de liberación del propóleo, los cuales no mostraron resultados favorecedores pues

con la mayoría había un problema de adhesión de los materiales cerosos a los punzones de la tableteadora.

Posteriormente nos enfrentamos a otro problema, se pensó en realizar una granulación húmeda con la finalidad de incorporar de manera homogénea el propóleo al resto de los excipientes, idea que no pudo llevarse a cabo debido a que el propóleo es un materia termosensible y a la temperatura convencional de secado se descomponía, perdiendo así su eficacia.

Finalmente después de muchos intentos se obtuvo la mezcla de excipientes que cumplía con las características que requería el bolo, con lo cual se prosiguió a probarla en los peces.

EXCIPIENTES UTILIZADOS EN LA FORMULACIÓN DEL BOLO.	
EXCIPIENTE.	% EN LA FORMULACIÓN.
PRINCIPIO ACTIVO (PROPÓLEO)	10
ADSORBENTE	10
DESINTEGRANTE	34.9
LUBRICANTE	45
COLORANTE	0.1

Tabla 3.- Excipientes utilizados en la formulación del bolo.

- Se pesan los excipientes en una balanza analítica.
- Se mezclan el adsorbente y el propóleo con la finalidad de que el propóleo sea de fácil compresión Mezcla 1 (M1).
- Se mezcla M1 con el resto de los excipientes por 10min.
- Se pesan 2g de esta mezcla, se colocan en la matriz y se comprimen a 3toneladas por 3 segundos.
- Se obtiene el bolo.
- Se colocan de manera individual en una bolsa hecho de tul para su utilización en peceras.



Figura 8.- Comprimidos de liberación modificada hechos a base de Propóleo. (Unidad de Investigación Multidisciplinaria, Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico – Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán – UNAM).

7.5. PRUEBAS *In Vivo*.

7.5.1 PRUEBA DE TOXICIDAD DE LOS BOLOS.

Se prepararon 3 lotes de bolo, el primero (lote placebo), fue un comprimido, el cual contenía todos los excipientes del bolo exceptuando al propóleo, el segundo (lote Toluca), contuvo como principio activo el extracto de propóleo de Toluca, el tercero (lote Hidalgo), tenía como principio activo el extracto de propóleo de Hidalgo.

Se dividieron 4 lotes (peceras), los peces a utilizar serán *Chirostoma* (30 peces por lote), con la siguiente distribución:

- Lote 1 blanco, este grupo consistió en colocar peces en las mismas condiciones ambientales y de alimento que al resto de los lotes.
- Lote 2 placebo, este grupo consistió en poner en contacto a los peces con comprimidos que contengan los excipientes del bolo exceptuando al propóleo.
- Lote 3 Hidalgo, este grupo consistió en poner en contacto a los peces con comprimidos que contengan como principio activo el extracto de propóleo de Hidalgo.
- Lote 4 Toluca, este grupo consistió en poner en contacto a los peces con comprimidos que contengan como principio activo el extracto de propóleo de Toluca.

A los peces (*Chirostoma*), se les alimentó diario con comida comercial y se les cambió la mitad del total del agua de las peceras 2 veces por semana, con la finalidad de ver la reacción que tienen los peces frente al bolo, se cuantificó el índice de mortalidad de los mismos.

Esta prueba se realizó por duplicado.



Figura 9.- Pecera con el comprimido de Propóleo de Toluca (Unidad de Investigación Multidisciplinaria, Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéutico – Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán – UNAM).

DISTRIBUCIÓN DE LOS LOTES.				
	30 peces.	30 peces.	30 peces.	30 peces.
CONTROL.	----	----	----	----
PLACEBO.	Bolo Placebo.	Bolo Placebo.	Bolo Placebo.	Bolo Placebo.
TOLUCA.	Bolo con Propóleo de Toluca.	Bolo con Propóleo de Toluca.	Bolo con Propóleo de Toluca.	Bolo con Propóleo de Toluca.
HIDALGO.	Bolo con Propóleo de Hidalgo.	Bolo con Propóleo de Hidalgo.	Bolo con Propóleo de Hidalgo.	Bolo con Propóleo de Hidalgo.

Tabla 4.- Distribución de los lotes para la prueba de toxicidad.

7.5.2 PRUEBA DE EFECTIVIDAD DE LOS BOLOS .

Se prepararon 3 lotes de bolos, el primero fue un placebo, el cual contuvo todos los excipientes del bolo exceptuando al propóleo, el segundo (lote Toluca), contenía como principio activo el extracto de propóleo de Toluca, el tercero (lote Hidalgo), contuvo como principio activo el extracto de propóleo de Hidalgo.

Los peces se dividieron en 5 lotes (peceras), con la siguiente distribución:

- Lote 1 blanco, este grupo consiste en colocar peces en las mismas condiciones ambientales y de alimento que al resto de los lotes.
- Lote 2 control, este grupo consiste en poner en contacto a los peces con una cepa viable de *Saprolegnia spp.*
- Lote 3 placebo, este grupo consiste en poner en contacto a los peces con una cepa viable de *Saprolegnia spp* así como con comprimidos que contengan los excipientes del bolo exceptuando al propóleo.
- Lote 4 Hidalgo, este grupo consiste en poner en contacto a los peces con una cepa viable de *Saprolegnia spp* así como con comprimidos que contengan como principio activo el extracto de propóleo de Hidalgo.
- Lote 5 Toluca, este grupo consiste en poner en contacto a los peces con una cepa viable de *Saprolegnia spp* así como con comprimidos que contengan como principio activo el extracto de propóleo de Toluca.

A los peces (*Chirostoma*), se les alimentó diario con comida comercial y se les cambió la mitad del total del agua de las peceras 2 veces por semana.

Esta prueba se realizó por triplicado.

DISTRIBUCIÓN DE LOS LOTES.				
	30 peces.	30 peces.	30 peces.	30 peces.
	<i>Saprolegnia spp.</i>	<i>Saprolegnia spp.</i>	<i>Saprolegnia spp.</i>	<i>Saprolegnia spp.</i>
CONTROL.	----	----	----	----
PLACEBO.	Bolo Placebo.	Bolo Placebo.	Bolo Placebo.	Bolo Placebo.
TOLUCA.	Bolo con Propóleo de Toluca.	Bolo con Propóleo de Toluca.	Bolo con Propóleo de Toluca.	Bolo con Propóleo de Toluca.
HIDALGO.	Bolo con Propóleo de Hidalgo.	Bolo con Propóleo de Hidalgo.	Bolo con Propóleo de Hidalgo.	Bolo con Propóleo de Hidalgo.

Tabla 5.- Distribución de los lotes para la prueba de efectividad.

8. RESULTADOS.

INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO RADIAL.

En las cajas se evidenció que el control “Ketoconazol” no causó inhibición en el crecimiento de la cepa de *Saprolegnia spp*, así mismo podemos observar que se presentó inhibición del crecimiento de la cepa en las tres concentraciones del extracto de propóleo que se utilizaron (Figuras 10 y 11).

Propóleo de Toluca.

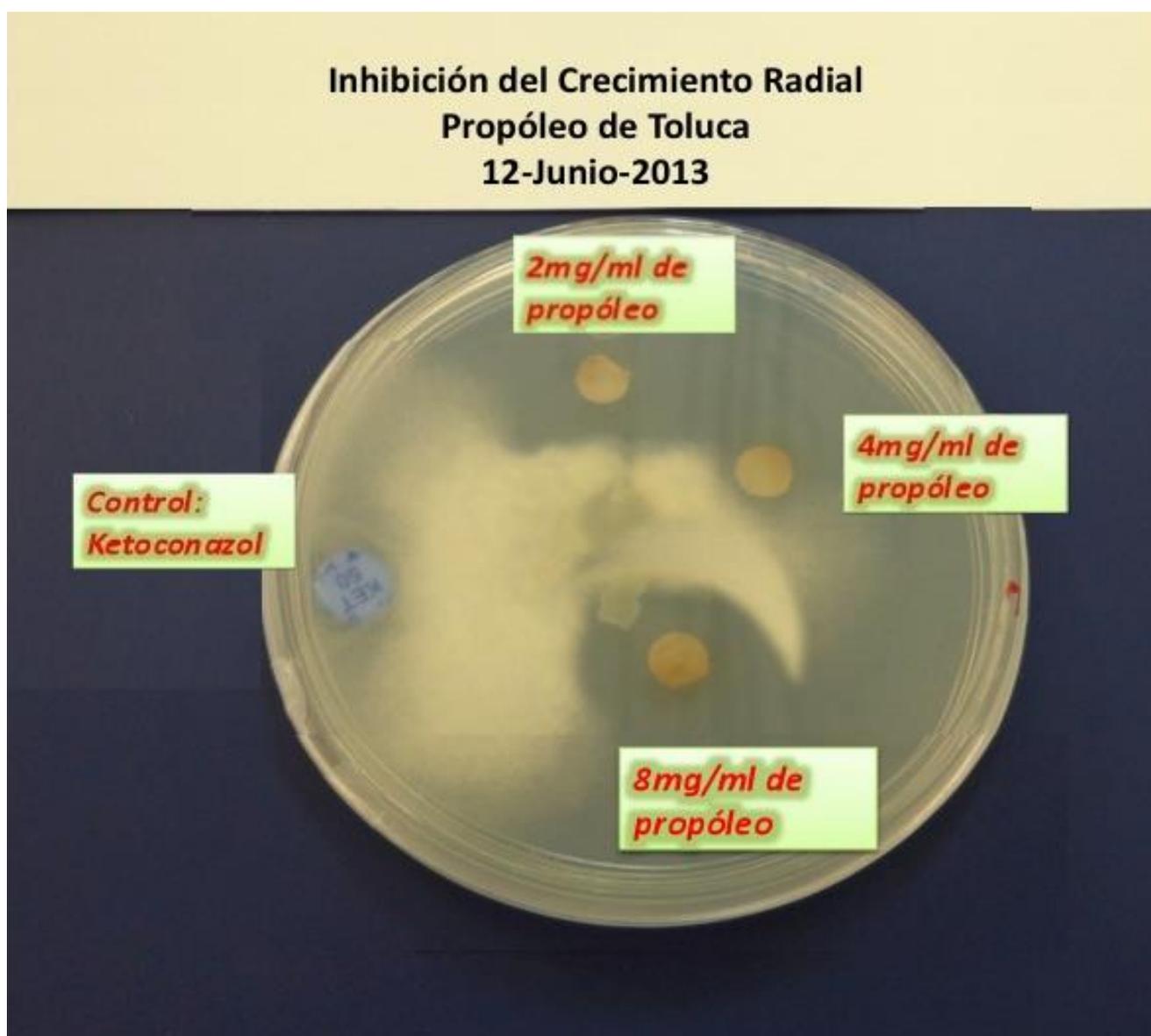


Figura 10.- Se muestra la formación de halos alrededor de los discos impregnados con el extracto de propóleo, así como el crecimiento masivo de la cepa sobre el disco impregnado con Ketoconazol.

Propóleo de Hidalgo.

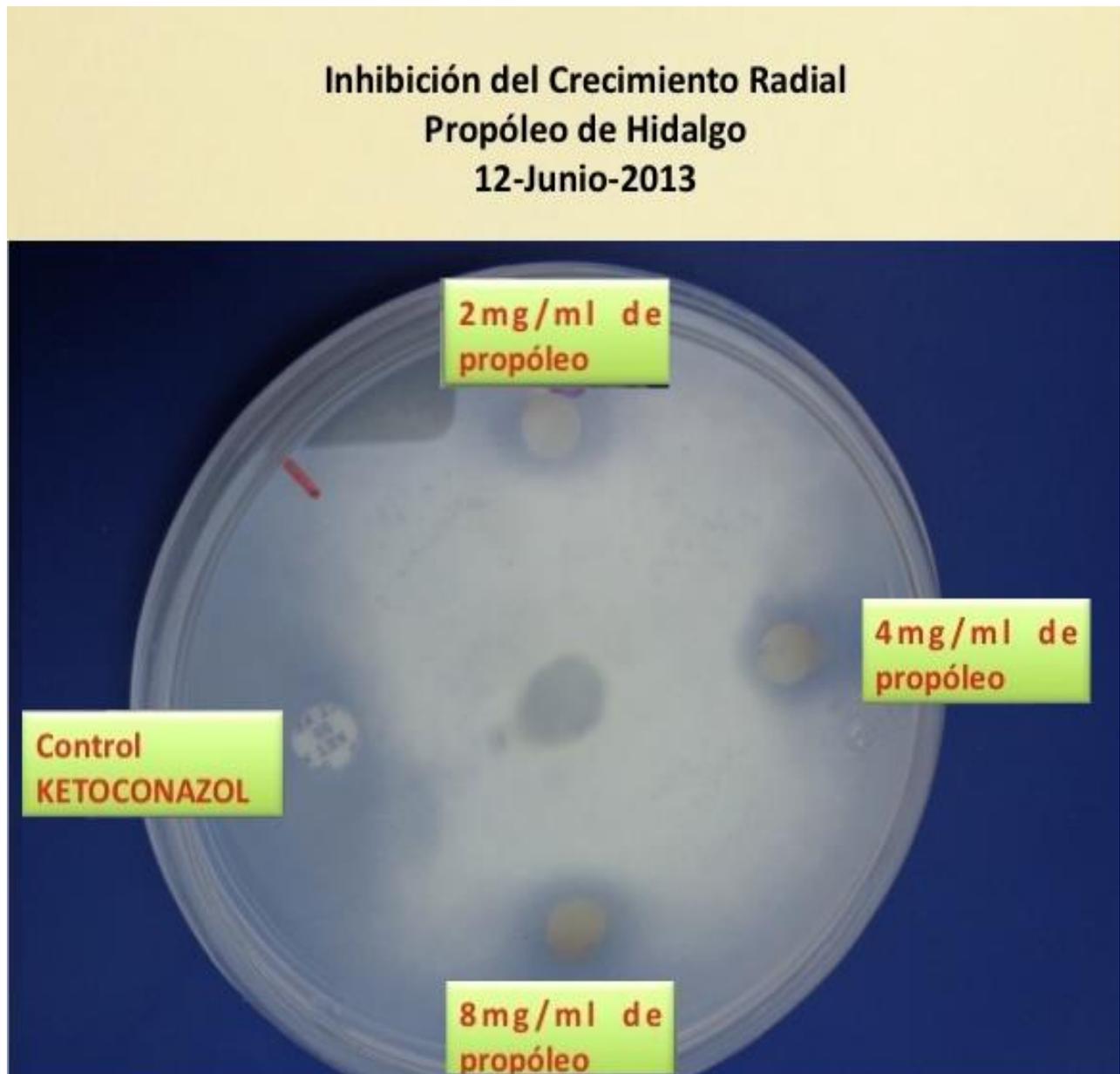


Figura 11.- Esta imagen muestra el crecimiento de *Saprolegnia spp* en la caja, alrededor de los discos impregnados con el extracto de propóleo a diferentes concentraciones.

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA.

Los resultados obtenidos en esta prueba se pueden visualizar en las figuras 12 y 13, así como en las tablas 6 a 9, mostrando una inhibición con ambos propóleos a partir de la concentración de 0.25mg/ml.

Propóleo de Toluca.

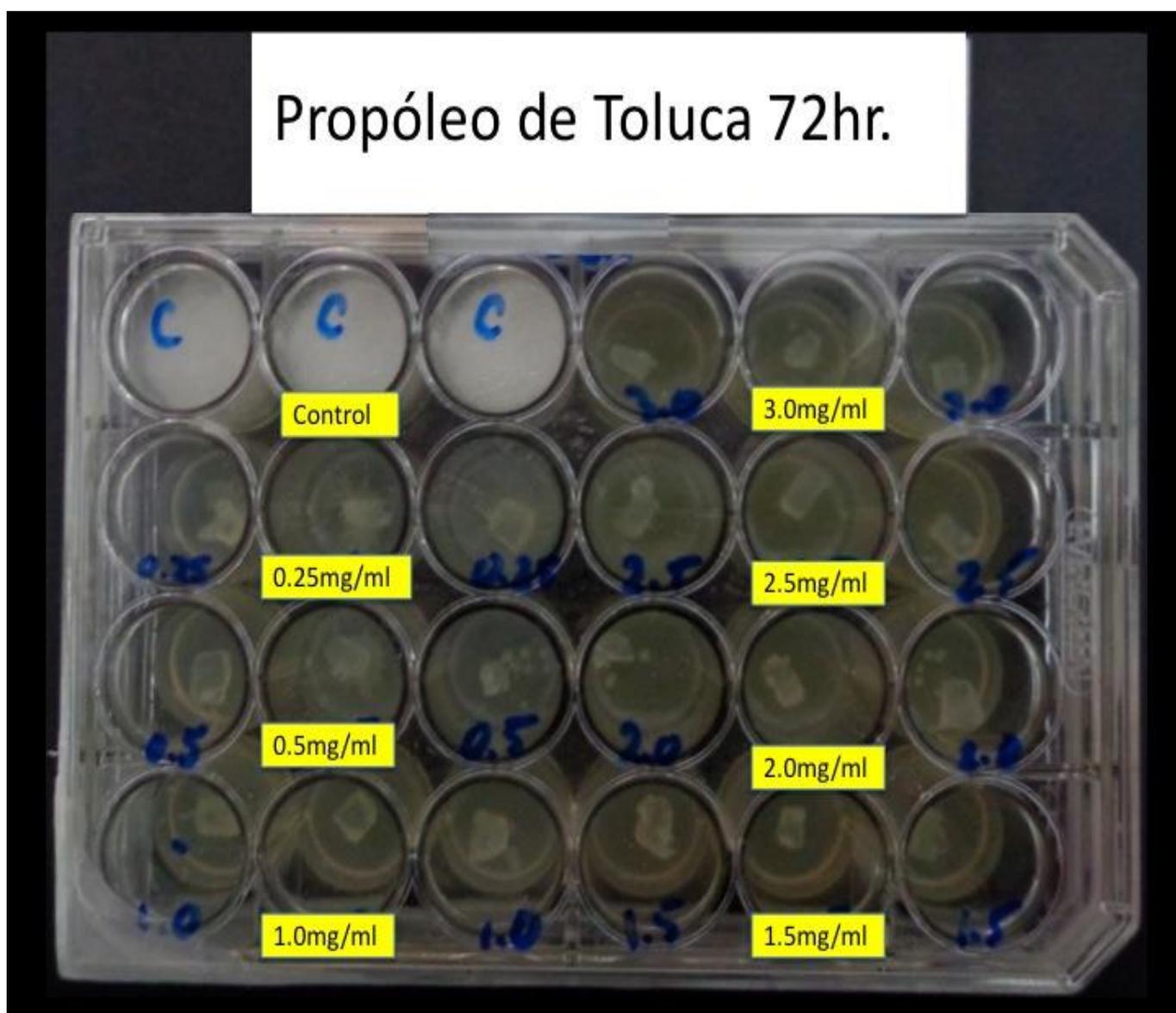


Figura 12.- En esta imagen se muestra el crecimiento de *Saprolegnia spp* utilizando diferentes concentraciones del propóleo de Toluca en las primeras 72hrs. Es posible observar crecimiento de la cepa solo en los pozos Control, donde no hay Propóleo, a partir de la concentración 0.25mg/ml hay una inhibición de la cepa de *Saprolegnia spp*, al igual que en el resto de las concentraciones.

Diámetro (cm) de la cepa utilizando propóleo de Toluca.				
Concentración/hrs.	24hrs	48hrs	72hrs	86hrs
Control	2	2	2	2
0.25mg/ml	0	0	0	0
0.5mg/ml	0	0	0	0
1.0mg/ml	0	0	0	0
1.5mg/ml	0	0	0	0
2.0mg/ml	0	0	0	0
2.5mg/ml	0	0	0	0
3.0mg/ml	0	0	0	0

Tabla 6.- Diámetro de las colonias de *Saprolegnia spp* en placa de 24 pozos usando propóleo de Toluca.

Porcentaje de Inhibición del Crecimiento de la cepa.		
Concentración.	Promedio del diámetro de la cepa.	% de reducción del crecimiento de la cepa.
Control	2.0	0
0.25mg/ml	0	100
0.5mg/ml	0	100
1.0mg/ml	0	100
1.5mg/ml	0	100
2.0mg/ml	0	100
2.5mg/ml	0	100
3.0mg/ml	0	100

Tabla 7.- En esta tabla se muestra el Porcentaje de Inhibición de Crecimiento de *Saprolegnia spp* usando propóleo de Toluca.

Propóleo de Hidalgo.

Prueba de Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria utilizando Propóleo de Hidalgo.



Figura 13.-En esta imagen se muestra el crecimiento de *Saprolegnia spp* utilizando diferentes concentraciones del propóleo de Hidalgo en las primeras 72hrs. Es posible observar crecimiento de la cepa solo en los pozo Control, donde no hay Propóleo, a partir de la concentración 0.25mg/ml hay una inhibición de la cepa de *Saprolegnia spp*, al igual que en el resto de las concentraciones.

Diámetro (cm) de la cepa utilizando propóleo de Hidalgo.				
Concentración/hrs	24hrs	48hrs	72hrs	86hrs
Control	2	2	2	2
0.25mg/ml	0	0	0	0
0.5mg/ml	0	0	0	0
1.0mg/ml	0	0	0	0
1.5mg/ml	0	0	0	0
2.0mg/ml	0	0	0	0
2.5mg/ml	0	0	0	0
3.0mg/ml	0	0	0	0

Tabla 8.- Diámetro de las colonias de *Saprolegnia spp* en placa de 24 pozos usando propóleo de Hidalgo.

Porcentaje de Inhibición del Crecimiento de la cepa.		
Concentración.	Promedio del diámetro de la cepa.	% de reducción del crecimiento de la cepa.
Control	2.0	0
0.25mg/ml	0	100
0.5mg/ml	0	100
1.0mg/ml	0	100
1.5mg/ml	0	100
2.0mg/ml	0	100
2.5mg/ml	0	100
3.0mg/ml	0	100

Tabla 9.- Porcentaje de Inhibición de Crecimiento de *Saprolegnia spp* usando propóleo de Hidalgo.

COMPARACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE *Saprolegnia* spp.

Los resultados se pueden apreciar en las

27. Análisis Macroscópico.

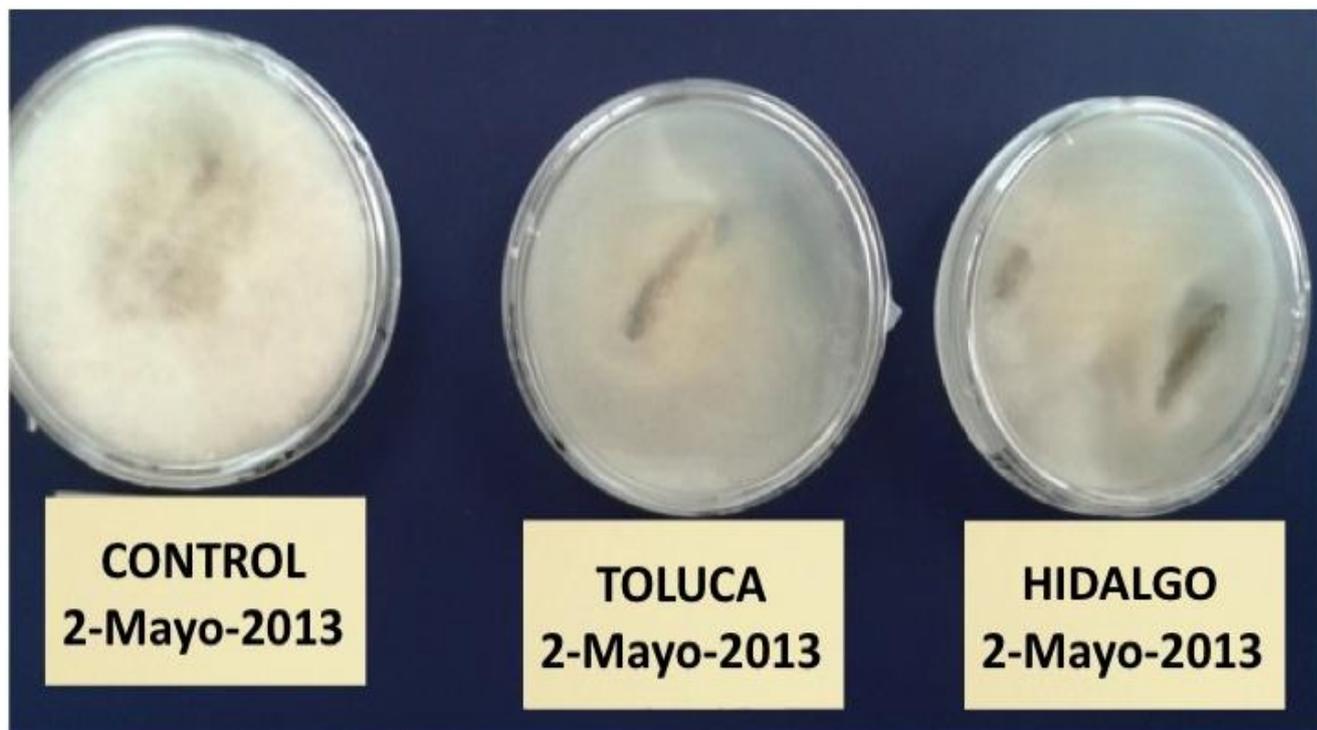


Figura 14.- Diferencias macroscópicas del crecimiento de *Saprolegnia* spp, en peces que tuvieron contacto con bolos de Toluca e Hidalgo y el que solo tuvo contacto con el hongo (Unidad de Investigación Multidisciplinaria, Laboratorio de Micología – Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán - UNAM). Se observó un crecimiento más abundante y blanquecino en el control, con respecto a los otros 2 lotes, que presentaron un crecimiento, escaso y lento.

PEZ CON SAPROLEGNOSIS



Figura 15.- Pez (*Chirostoma*) con Saprolegniasis. (Unidad de Investigación Multidisciplinaria, Laboratorio de Micología – Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán - UNAM). Se observan las lesiones características ocasionadas por *Saprolegnia*.

B) Análisis Microscópico

Las alteraciones ocasionadas por el propóleo se observan en las figuras 15 y 16.

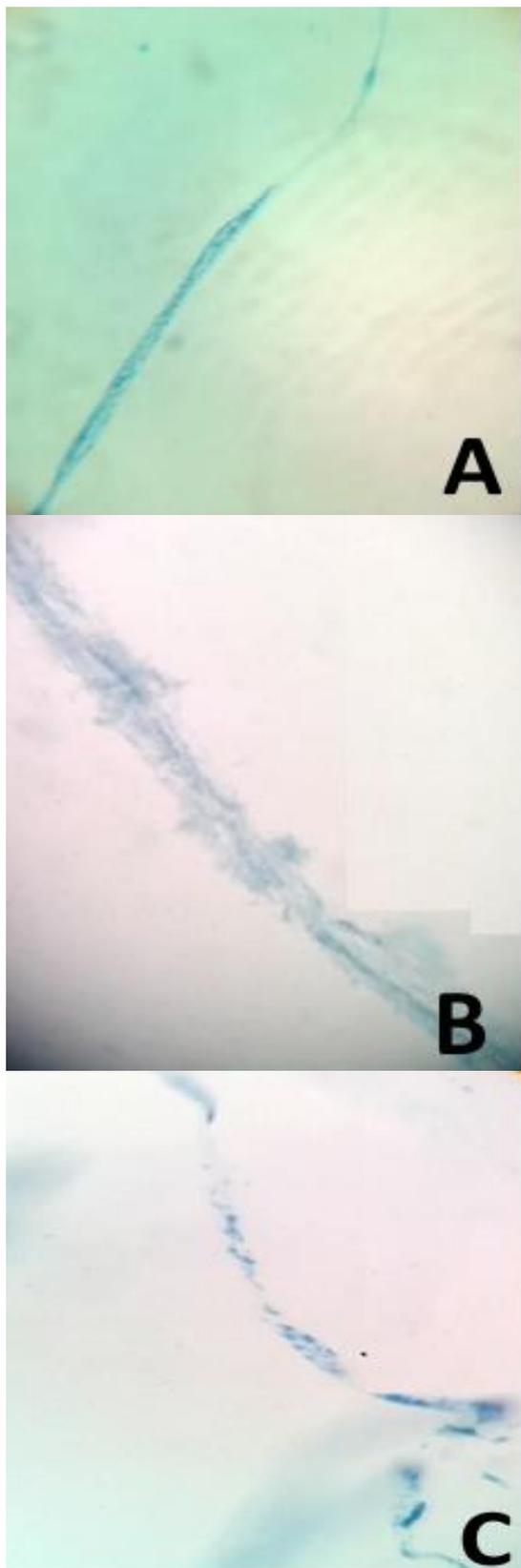


Figura 16.- Comparación de la cepa de *Saprolegnia spp* con y sin uso de propóleo. Tinción de algodón 40X. En la imagen **A** (sin propóleo), puede observarse una hifa delgada, completa y sin alteraciones en la membrana. La imagen **B** presenta una cepa de *Saprolegnia spp* tratada con el bolo a base de propóleo de Hidalgo, en la cual es posible visualizar una hifa ensanchada, con bordes no definidos, es evidente el daño ocasionado en la membrana celular de la cepa por el efecto del propóleo. Finalmente la imagen **C** (propóleo de Toluca), muestra una hifa delgada, pero en la que ya no se distinguen partes de la membrana celular.

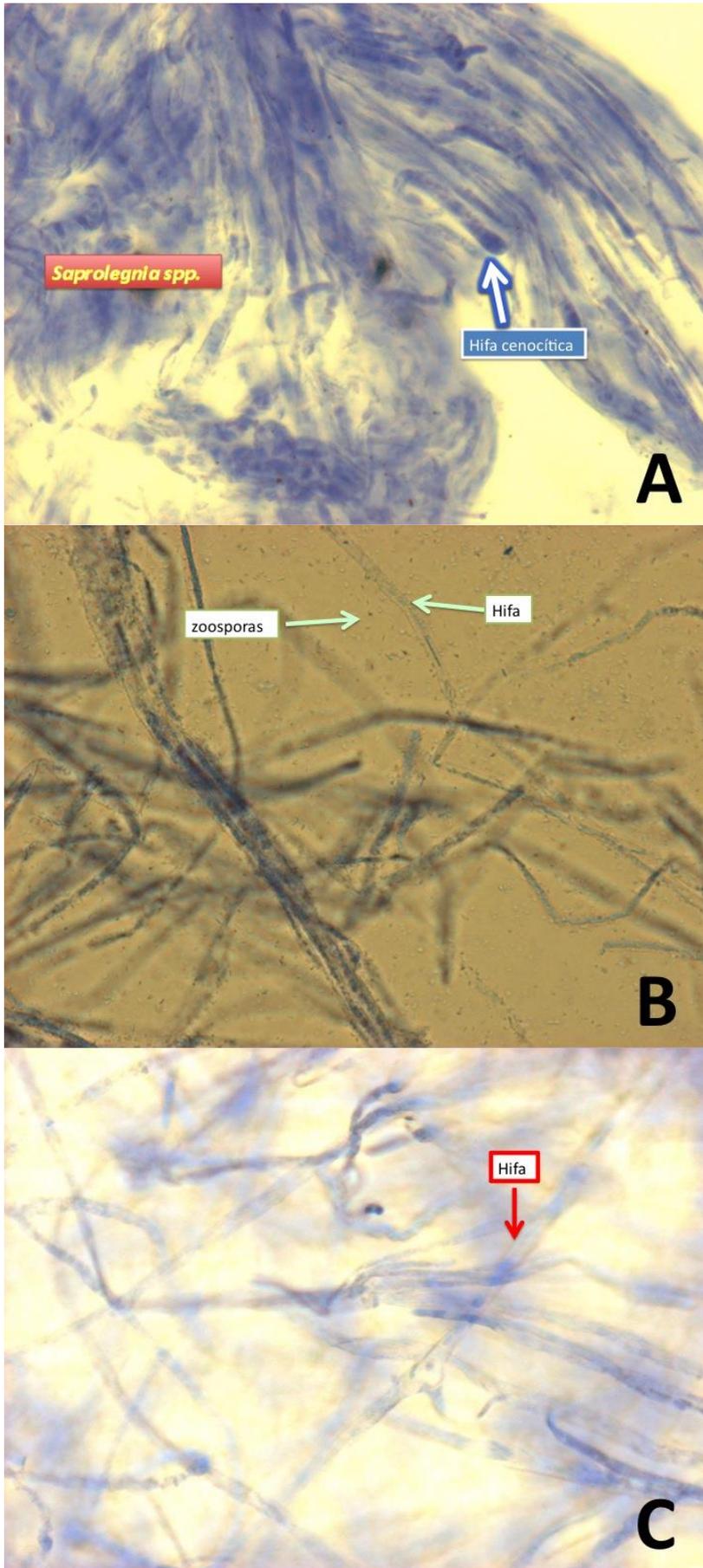
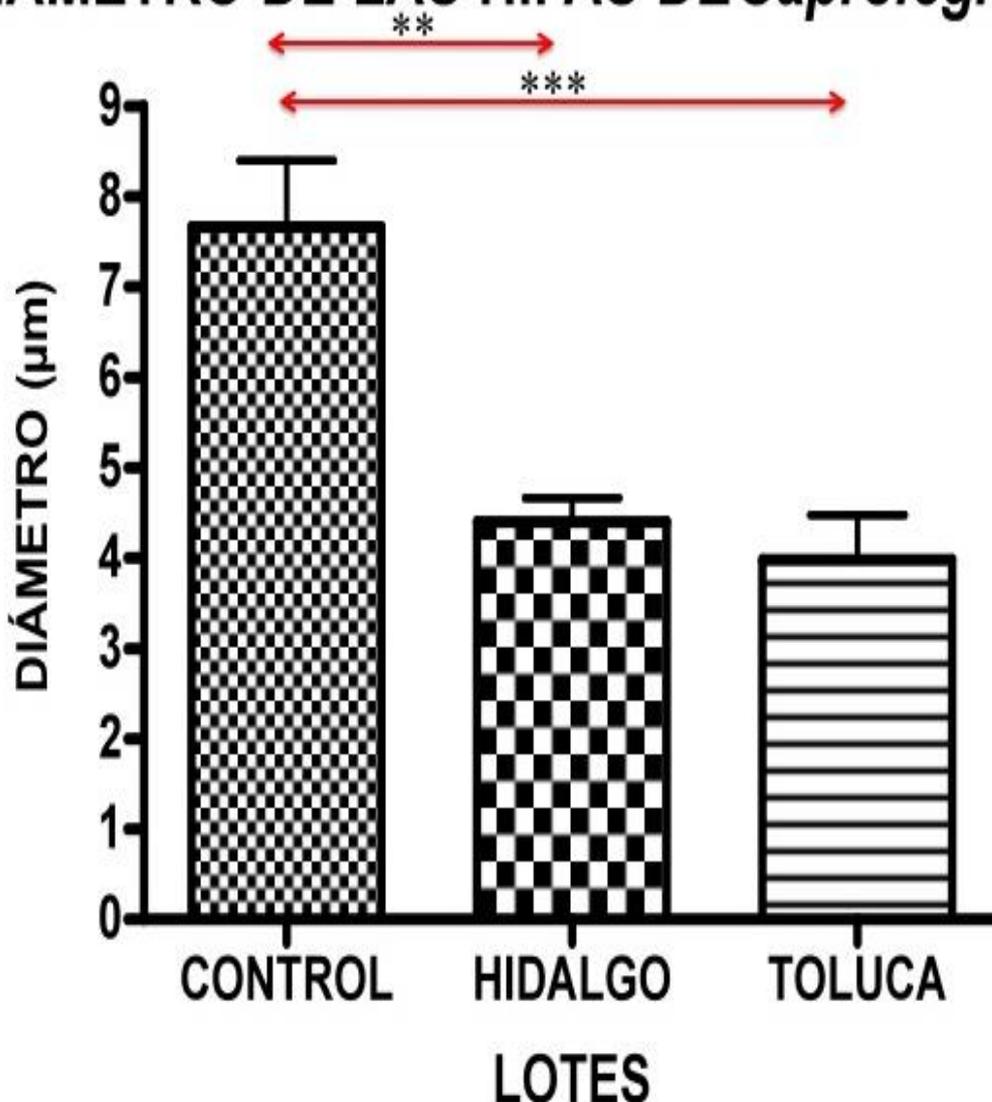


Figura 17.- Comparación del crecimiento de la cepa de *Saprolegnia spp.*, con y sin uso de Propóleo en la cual se observa una disminución en el tamaño del diámetro de las hifas. Tinción azul de algodón vista con el objetivo 20X. (Unidad de Investigación Multidisciplinaria, Laboratorio de Micología - Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán - UNAM). En la imagen **A** se observan las características de la cepa, que son hifas bien definidas. En la imagen **B** la cepa de *Saprolegnia* se muestra malformada a causa del propóleo, así como las zoosporas esparcidas fuera de las hifas. Y finalmente en la imagen **C** se puede visualizar a la cepa de *Saprolegnia spp.*, tratada con el propóleo de Toluca, en donde es posible observar una disminución evidente en la cantidad de las hifas, así como una

DIÁMETRO DE LAS HIFAS DE *Saprolegnia* spp.



Gráfica 1.- Se muestra la reducción en el diámetro de las hifas tratadas con propóleo, con respecto al tamaño de las hifas del lote control. **($P < 0.01824$) *** ($P < 0.0001$).

COMPARACIÓN EN EL DIÁMETRO DE LAS HIFAS (µm)							
	HIFA 1	HIFA 2	HIFA 3	HIFA 4	HIFA 5	PROMEDIO	% de disminución
CONTROL	8.8	5.1	9.2	7.1	8.1	7.66	---
HIDALGO	5.7	4.2	3.6	2.7	3.7	3.98	48.05%
TOLUCA	5.2	4.2	4.6	4.4	3.6	4.4	42.55%

Tabla 10.- En esta tabla se muestran los diámetros de las hifas de cada una de las muestras en las cuales se puede ver una disminución del tamaño en las cepas tratadas con propóleo.

PRUEBA DE TOXICIDAD.

Esta prueba se realizó por duplicado y se observó que el tratamiento de Propóleo no solo no fue tóxico para los peces, además prolongó el tiempo de vida de los mismos.; los resultados se pueden observar en las tablas 11 y 12, así como en la gráfica 2.

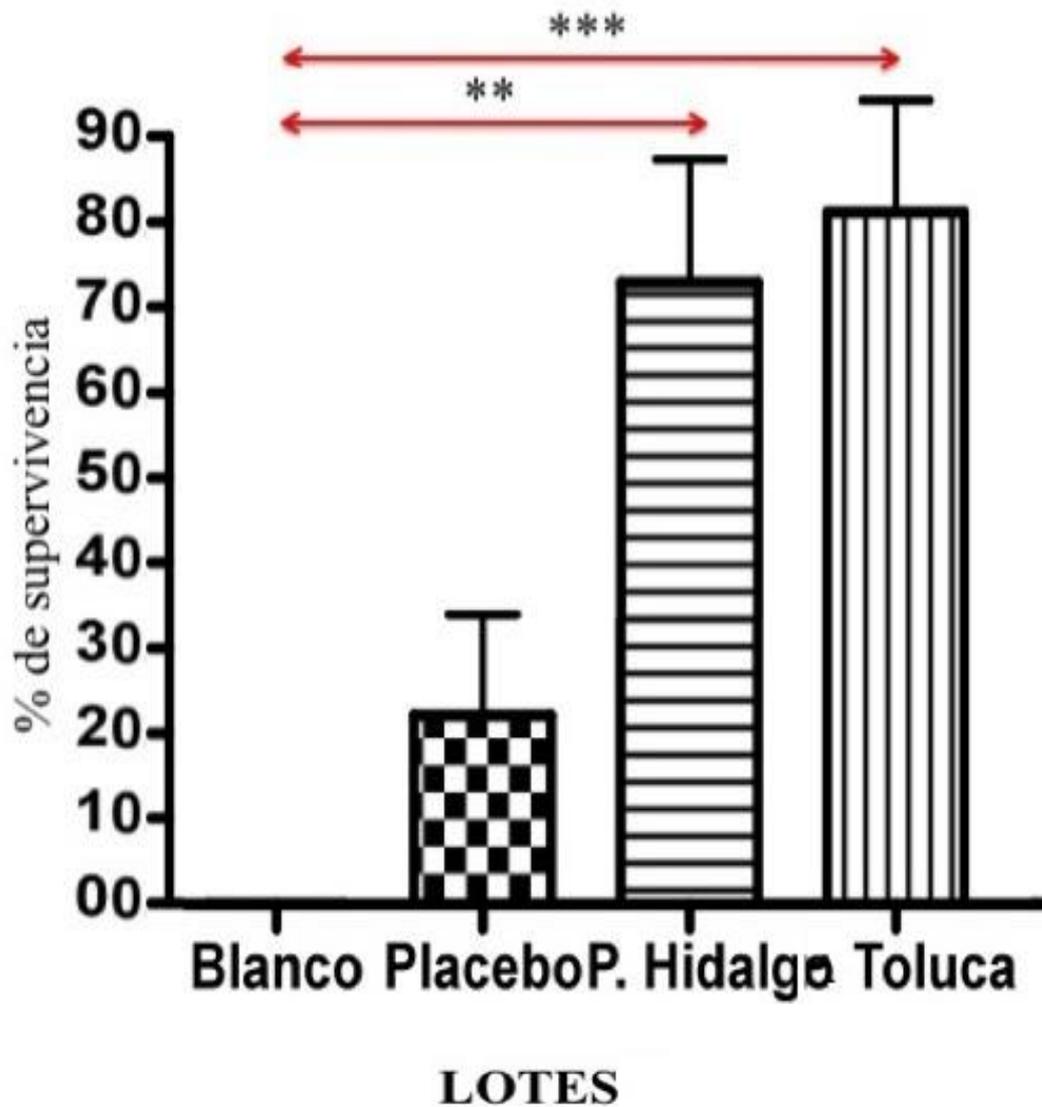
Muertes registradas en la prueba de Toxicidad.				
Fecha	Blanco	Placebo	P. Hidalgo	P. Toluca
08-feb-13	2	0	0	0
09-feb-13	2	2	1	1
13-feb-13	2	0	1	1
15-feb-13	3	1	0	1
19-feb-13	2	2	0	0
20-feb-13	2	2	1	0
22-feb-13	2	1	0	0
23-feb-13	2	1	0	1
25-feb-13	3	1	1	0
26-feb-13	5	1	3	0
27-feb-13	3	3	2	0
28-feb-13	2	1	0	0

Tabla 11.- En esta tabla se muestran los resultados obtenidos a lo largo de la prueba de toxicidad, observándose las fechas y el número de bajas, misma donde se puede observar que hay un mayor número de bajas en el lote blanco con respecto a los tratados con los bolos.

Porcentaje de Mortalidad y Supervivencia en la prueba de Toxicidad.				
Lotes.	Blanco.	Placebo.	Hidalgo.	Toluca.
# de Muertes.	30	24	9	4
# de peces vivos.	0	6	21	26
% de mortalidad.	100	80	30	13.3
% de supervivencia.	0	20	70	86.7

Tabla 12.- En esta tabla se muestran las diferencias numéricas de % de mortalidad y % de supervivencia entre los lotes estudiados en la prueba de Toxicidad.

Prueba de Toxicidad



Gráfica 2.- Se muestra el incremento en el tiempo de vida media de los peces comparando los que no fueron tratados con respecto a los que estuvieron en contacto con los bolos que contenían propóleo y los placebos de estos bolos. ******($P < 0.01824$) ******* ($P < 0.0001$).

PRUEBA DE EFECTIVIDAD.

Esta prueba se realizó por triplicado y se observó una disminución en la mortalidad de los peces que estuvieron en contacto con los bolos.; los resultados se pueden observar en las tablas 13 y 14, así como en la gráfica 3.

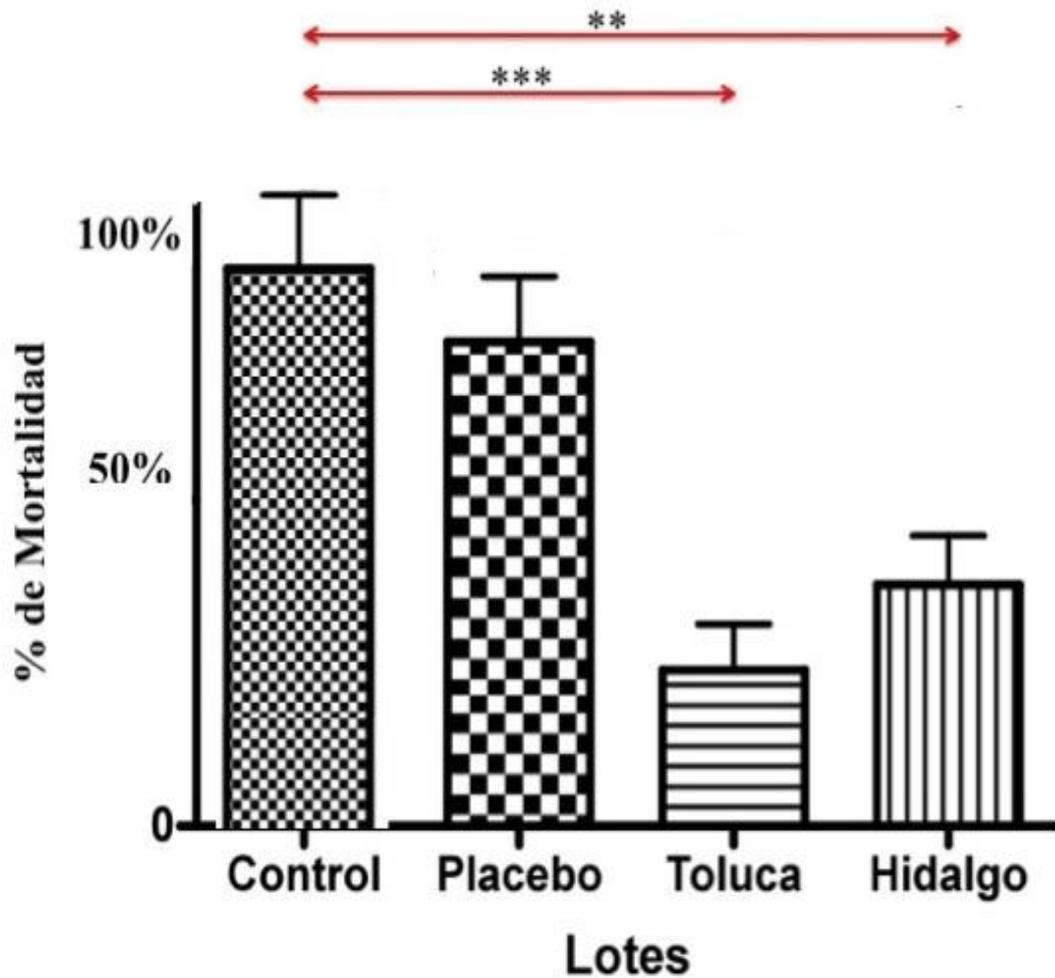
Muertes registradas en la prueba de Efectividad del bolo.												
Fecha	Control 1	Control 2	Control 3	Placebo 1	Placebo 2	Placebo 3	Toluca 1	Toluca 2	Toluca 3	Hidalgo 1	Hidalgo 2	Hidalgo 3
21-05-13	4	1	1	1	1	2	1	0	0	2	1	1
22-05-13	1	0	1	0	0	1	0	0	1	2	2	0
23-05-13	2	4	2	0	2	2	0	1	0	1	1	0
24-05-13	2	3	2	3	1	2	0	0	0	0	1	0
25-05-13	2	3	2	0	1	1	2	0	0	0	2	0
26-05-13	0	7	0	0	0	0	1	0	0	0	5	1
27-05-13	3	3	4	0	3	2	0	0	0	0	1	0
28-05-13	0	5	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
29-05-13	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30-05-13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
31-05-13	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
01-06-13	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
02-06-13	0	0	0	0	0	4	1	0	0	0	0	0
03-06-13	1	0	3	2	1	4	0	0	0	0	0	0
04-06-13	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
05-06-13	1	0	1	1	1	2	0	0	0	0	0	0
06-06-13	0	0	3	0	1	0	1	1	0	1	1	2
07-06-13	3	0	7	4	3	0	0	1	0	0	1	0
08-06-13	1	0	1	3	1	0	5	3	0	0	2	0
09-06-13	3	2	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0
10-06-13	5	0	8	8	8	0	0	1	0	0	3	2
11-06-13	1	0	0	1	3	0	1	1	2	2	2	1
12-06-13	2	0	0	3	0	0	2	2	0	3	4	0

Tabla 13.- En esta tabla se muestran los resultados obtenidos a los largo de la prueba de efectividad, observándose las fechas y el número de bajas.

Porcentaje de Reducción de la Mortalidad en la prueba de efectividad del bolo.			
Lotes.	# de Muertes.	% de mortalidad.	% de reducción de la mortalidad.
Control.	98	100	
Placebo.	78	79	21
Toluca.	27	27	73
Hidalgo.	46	46.93	53.07

Tabla 14.- En esta tabla se muestran las diferencias numéricas del % de mortalidad y % de reducción de la mortalidad entre los lotes estudiados en la prueba de Efectividad.

Prueba de Efectividad del Bolo con Propóleo (Porcentaje de Mortalidad)



Gráfica 3- Se muestra la disminución del porcentaje de mortalidad en los peces comparando los que no fueron tratados con respecto a los que estuvieron en contacto con los bolos que contenían propóleo y los placebos de estos bolos. **($P < 0.001$) *** ($P < 0.0001$).

9. DISCUSIÓN.

Con base en los resultados obtenidos en las pruebas realizadas, encontramos que esta cepa de *Saprolegnia spp* es susceptible a los extractos blandos de propóleo de Toluca e Hidalgo.

Se optó por utilizar el Agar Dextrosa y Papa (PDA), en las pruebas realizadas, debido a que fue en este agar en donde *Saprolegnia spp* mostró un mejor y más rápido crecimiento, en comparación con otros medios de cultivo para hongos, algunos de los agares probados son Borelli, Saboreaud Dextrosa Agar (SDA), y finalmente PDA, como lo menciona Parra et. al. (2008).

Con respecto a la prueba de inhibición del crecimiento radial (Figura 10), se observó la formación de halos de inhibición alrededor de los discos impregnados con diferentes concentraciones del Extracto Blando de Propóleo de Toluca, así mismo es posible observar el crecimiento masivo de la cepa de *Saprolegnia spp* sobre el disco impregnado con el control de Ketoconazol. El Ketoconazol produce un ataque a nivel metabólicos en la vía de biosíntesis del ergosterol, un esterol presente en la membrana plasmática de todos los hongos (incluyendo *Saprolegnia spp*), al faltar el ergosterol la membrana plasmática del hongo se ve desestabilizada (Jiménez 2007), lo que inhibe el crecimiento del hongo; sin embargo en esta placa se observa que la cepa fue resistente al control de Ketoconazol. Por otra parte en la placa en la cual se usó el propóleo de Hidalgo (Figura 11) podemos observar la presencia de un halo de mayor tamaño alrededor del disco impregnado con el control Ketoconazol a comparación de los halos observados alrededor de los discos impregnados con las diferentes concentraciones del extracto de propóleo. Esta prueba demuestra que sí hay una inhibición en el crecimiento de *Saprolegnia spp* en las 3 concentraciones utilizadas del extracto de propóleo, sin embargo el resultado es más evidente con el propóleo de Toluca comparado con el de Hidalgo.

En cuanto a la determinación de la concentración mínima inhibitoria, en la figura 12 podemos observar que en la placa de 24 pozos solamente hubo crecimiento de la cepa en los pozos control, lo cual demuestra que en el caso del extracto de propóleo de Toluca hay una inhibición del crecimiento de *Saprolegnia spp* desde

una concentración de 0.25mg/ml, lo que representa una reducción del crecimiento de la cepa en un 100% a partir de dicha concentración (ver Tabla 7), esta prueba se monitoreo las primeras 86 horas debido que a las horas posteriores ya no hubo cambio alguno. Sin embargo el extracto del propóleo de Hidalgo tuvo un comportamiento muy similar (ver figura 13), debido a que solamente hubo crecimiento de la cepa en los pozos control mostrando un crecimiento abundante del hongo en las primeras 48 horas a partir de las cuales ya no hubo un cambio significativo en las características de la cepa, motivo por el cual la prueba solo se monitoreo las primeras 86 horas; en este caso como en el anterior también se realizó la cuantificación de los diámetros y la reducción del crecimiento de la cepa, resultados que se muestran en las tablas 8 y 9, también se demuestra que la concentración mínima inhibitoria de *Saprolegnia spp* utilizando un extracto de propóleo de Hidalgo es de 0.25mg/ml. Sin embargo encontramos que en un trabajo anterior (Evidencia microscópica del daño causado por el propóleo sobre *Saprolegnia spp*. Cruz L et. al 2011), la concentración mínima inhibitoria que se encontró con un propóleo mexicano sobre la cepa de *Saprolegnia spp* fue de 1mg/ml, con lo cual no coincidimos, lo que se puede argumentar en este caso es que dependiendo del lugar de donde se haga la cosecha del propóleo varían la cantidad y calidad de los componentes, así mismo influye el tiempo que lleve almacenado dicho propóleo, lo que se recomienda en este caso es comparar los resultados y en caso necesario determinar un rango en las concentraciones mínimas inhibitorias.

Por otra parte, se realizó una comparación de las características morfológicas de *Saprolegnia spp* y los resultados macroscópicos fueron evidentes, en la figura 14 se observan 3 placas de Agar Dextrosa y Papa en las cuales se colocaron peces muertos el mismo día de los cuales 2 estuvieron en contacto con la cepa de *Saprolegnia spp*; la primera placa corresponde a control, es decir un pez que se mantuvo en las mismas condiciones de temperatura y alimento con respecto a los otros lotes (se colocó la misma cantidad de *Saprolegnia spp* en todas las peceras), sin embargo esta cepa se muestra más abundante en comparación a las 2 siguientes, debido a que el hongo se proliferó por toda la caja, en el caso de la placa etiquetada como Toluca 2, la cepa creció de manera menos abundante, su

aspecto no es tan esponjoso comparado con la cepa de la caja anterior, en cuanto a la tercera caja igual podemos apreciar un pobre crecimiento de *Saprolegnia spp* que no se ve esponjoso ni tan abundante en comparación de la primer caja. Gutiérrez (2011), nos dice que el ácido cinámico y algunos flavonoides que se encuentran presentes en el propóleo ocasionan una desorganización del material citoplasmático, sin embargo aún hacen falta más estudios para lograr dar una explicación más exacta de la causa y el mecanismo que originan dichas alteraciones en la cepa de *Saprolegnia spp*.

En lo que se refiere al análisis microscópico, se compararon cepas cultivadas a partir de peces que estuvieron en contacto con los bolos del propóleo de Hidalgo (ver figura 16), en la figura **A** se muestra una hifa cenocítica “sin septos”, bien definida, en la figura **B** se aprecia una hifa que presenta deformación de la membrana, ensanchada y con muy pocas zoosporas dentro, tomando en cuenta que la figura A es el control, B, es la imagen de la cepa tratada con los bolos de propóleo, se demuestra que el propóleo de Hidalgo tiene un efecto importante sobre la membrana celular de la cepa de *Saprolegnia spp* puesto que la desnaturaliza haciendo que el contenido celular sea esparcido alrededor de las hifas.

En cuanto al propóleo de Toluca, en la figura **C** se muestra una hifa sin definición membranal, con escasas zoosporas dentro, cabe mencionar que en este caso los efectos producidos por el propóleo de Toluca sobre la cepa de *Saprolegnia spp* son más evidentes, debido a que en este caso si fue posible observar zonas en las que la hifa estaba totalmente rota, así como pequeños puntos azules que se asume eran parte del contenido celular de la hifa que se esparcieron en el medio.

Se pudo observar y analizar la disminución en los diámetros de las hifas de los diferentes lotes tratados con y sin propóleo (ver figura 17), en el caso del lote control (Imagen A) se pueden ver hifas uniformes, firmes y abundantes, muy contrario a lo que se puede observar en la imagen B en la que se muestra una cepa tratada con propóleo de Hidalgo, en la cual se aprecian hifas menos abundantes, cabe mencionar que aparecen las zoosporas fuera de las hifas, lo que evidencia una ruptura de la membrana celular, así mismo en la imagen C las cepa

que fue tratada con el propóleo de Toluca muestra pocas hifas, delgadas y con pocas zoosporas dentro de la membrana celular.

Al analizar los diámetros de 5 hifas diferentes de cada lote pudimos observar una disminución significativa en el tamaño (ver gráfica 1), pues como lo muestra la tabla 10, hay una disminución de tamaño en el diámetro de las hifas del lote de Hidalgo del 48.05% con respecto al tamaño de las hifas del lote control y una disminución del 42.55% del tamaño de las hifas del lote Toluca, con respecto al lote control, lo cual denota el daño celular ocasionado por el propóleo en la cepa de *Saprolegnia spp.*

En relación a la prueba de Toxicidad de los bolos, en la tabla 11 se observa el número de muertes obtenidas en el tiempo que duró la misma, demostrando un número mayor de muertes en el lote control, la tabla 12 muestra que el porcentaje de supervivencia de los peces se aumentó en los lotes que fueron tratados con dichos bolos, así mismo se observó que hubo un porcentaje de mortalidad menor en el lotes de Toluca en comparación al lotes de Hidalgo (13.3% y 30% respectivamente), lo que comprueba 2 cosas considerando que la prueba se realizó por duplicado, la primera, que el efecto benéfico para los peces del propóleo de Toluca es superior al de Hidalgo y la segunda, que los bolos pueden ser utilizados como preventivo, ya que en esta prueba no se usó la cepa de *Saprolegnia spp.* La gráfica 2 muestra el porcentaje de supervivencia de los lotes, donde fácilmente se identifica el considerable incremento de la misma en los lotes tratados con los bolos, mostrando que no hay significancia estadísticamente hablando del lote blanco al lote placebo, lo que quiere decir que no presentó gran diferencia pues el número de peces que sobrevivió en el lote placebo (6 de un total de 30), pudo ser por efecto del azul de metileno (componente de la formulación de los bolos), sin embargo los lotes en los que estuvo presente el propóleo el porcentaje de supervivencia fue muchísimo mayor.

Finalmente en la tabla 13 se muestran las muertes presentadas en la prueba de Efectividad de los bolos, siendo evidentes que en los lotes control (es decir en los que los peces solo estuvieron en contacto con la cepa de *Saprolegnia spp.*), el

número de muertes fue mayor y más constante, lo cual se comprueba en la tabla 14, donde podemos visualizar que el porcentaje de mortalidad se redujo en un 21% con respecto del lote placebo, nuevamente se le atribuye esta disminución al efecto del azul de metileno; en un 53.07% con respecto al lote tratado con el propóleo de Hidalgo y por último en un 73% con respecto del lote tratado con el propóleo de Toluca, teniendo nuevamente éste propóleo el resultado más satisfactorio, como lo muestra la gráfica 3 en donde se visualiza que no existe significancia estadística entre los lotes Control y Placebo, pero que si hay significancia ($P < 0.001$), al comparar el lote de Hidalgo con el control; y una aún más evidente ($P < 0.0001$), comparando al lote Toluca con el control, lo que demuestra que los bolos a base de propóleo, no solo no son tóxicos para los peces en condiciones normales, sino que prologan el tiempo de vida de los mismos, además son efectivos al momento de evitar la infección que produce *Saprolegnia spp* al estar en contacto y en altas concentraciones con los peces.

Por todo lo anterior se dice que el propóleo es efectivo para inhibir el crecimiento e impedir la infección que produce *Saprolegnia spp*, así como que existe diferencia entre el grado de efectividad de propóleo a propóleo, evidenciando en este caso que el extracto de propóleo procedente de Toluca es más efectivo que el procedente de Hidalgo.

10. CONCLUSIONES.

- Se analizó la actividad *In vitro* e *In vivo* de propóleos provenientes de los estados de Toluca e Hidalgo sobre una cepa de *Saprolegnia spp* comprobando que la ésta presentó sensibilidad a ambos propóleos, sin embargo se demostró que el efecto más notorio en todas las pruebas lo tuvo el Extracto de Propóleo de Toluca.
- El efecto que tiene el propóleo sobre *Saprolegnia spp* fue la ruptura de la membrana celular que ocasionan los propóleos de Toluca e Hidalgo, sobre la hifa de *Saprolegnia spp*.
- Se determinó cualitativamente la inhibición causada por ambos propóleos en la cepa de *Saprolegnia spp* con la prueba de Inhibición del Crecimiento Radial, en la cual no solo se observó que sí existe dicha inhibición en las concentraciones a las que se trabajó (2mg/ml, 4mg/ml y 8mg/ml), sino que el ketoconazol no inhibió el crecimiento de esta cepa.
- Los propóleos de Toluca e Hidalgo inhibieron el crecimiento de *Saprolegnia spp*, a una concentración de 0.25mg/ml para los ambos, mediante la prueba de dilución en placa de 24 pozos.
- Se desarrolló un comprimido de liberación modificada para peceras, utilizando como principio activo Propóleo, mostrando en la prueba de Toxicidad un incremento en la supervivencia de los peces de 70% (Hidalgo), y 86.7% (Toluca). En la prueba de Eficacia disminuyó la tasa de mortalidad significativamente 73% (Toluca), y 53.07% (Hidalgo).
- Se obtuvo un comprimido a base de propóleo que se propone como tratamiento preventivo de Saprolegnosis en peceras, teniendo un considerable efecto económico al prevenir la infección y alargar el tiempo de vida de los peces (*Chirostoma*).
- Concluyendo, el más efectivo fue el bolo que contenía el propóleo de Toluca.

11. RECOMENDACIONES.

Se recomienda seguir con esta línea de investigación con la finalidad de determinar el mecanismo de acción del propóleo sobre la cepa de *Saprolegnia spp.*

Evaluar el daño celular que provoca el propóleo contenido en los bolos sobre la cepa de *Saprolegnia spp.*

Otra recomendación es establecer una normatividad en México que regule la calidad de los propóleos que salen a la venta, con la finalidad de estandarizarlos para asegurar su calidad y eficiencia.

De seguir con este proyecto de investigación, y con base en los antecedentes de los peces susceptibles a este hongo, se puede probar su efectividad en las infecciones ocasionadas por *Saprolegnia spp* en Salmón (*Salmo Salar*), trucha (*Oncorhynchus mykiss*) y Ajolote mexicano (*Ambystoma mexicanum*).

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- 1) Ahmed Imran and Kasraian Kasra. 2002. "Pharmaceutical challenges in veterinary product development" *Advanced drug delivery reviews*. 54. 871-882.
- 2) Alaniz, R. Et al. 2008 Actividad antibacteriana de extractos etanólicos de propóleos recolectados de apiarios del Estado de Jalisco, México. Avances en la investigación científica en el CUCBA, XIX Semana Nacional de la Investigación, 599-574.
- 3) Alderman, D. J. 1994. Control de oomycete pathogens in aquaculture, In: G. J. Mueller, ed, Salmon Saprolegniasis. Bonneville Power Administration, Div. Fish and Wildlife, Portland,OR. pp 111-130.
- 4) Alvarez Ávila, Guadalupe. 2003. "Desarrollo y validacion de procesos farmaceuticos : caracterizacion fisica y funcional de la celulosa microcristalina silicificada en compresion directa" Tesis de Grado, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.
- 5) Amador Gonzalez, Enrique. 1995. "Caracterizacion fisica y mecanica de lactosas para compresion directa". Tesis de Grado, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.
- 6) Bangyeekhun, E., S. M. A. Quiniou, J. E. Bly, L. Cerenius. 2001. Characterisation of Saprolegnia sp. isolates from channel catfish, *Dis. Aquat. Org.* 45: 53-59.
- 7) Banker Girbert S. 2002. "Modern pharmaceuticals". Cuarta edición. Editado por Banker. Ed. Dekker. USA. p 501-523, 725-7333.
- 8) Bogdanov S. Porpolis: Composition, Healt, Medicine; review, Bee Product Science, <www.bee-hexagon.net> [Consulta 1 de Julio 2013].

- 9) Bonifaz A. 2010. *Micología Méica Básica*, tercera edición. Editoria Mc Graw Hill, México; 110-115.
- 10) Branson E. 2002. Efficacy of bronopol against infection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) with the fungus *Saprolegnia* species. *VetRec.* 151:539-441.
- 11) Bruno, D.W., and Wood, B.P. 1994. *Saprolegnia and other Oomycetes*. CABI Publishing.
- 12) Bullis, R. A., E. J. Noga, M. G. Levy. 1996. Production and preliminary characterization of monoclonal antibodies to *Saprolegnia parasitica*. *Mycol. Res.* 100: 489-494.
- 13) Cruz L. Etni, Londoño O Amparo, Moreno T Ana L., Cruz S. Tonatiuh. "Evidencia microscópica del daño causado por el propóleo sobre *Saprolegnia spp*". Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias. Cartagena Colombia. PANVET 2012.
- 14) Estrada García, Perla Alejandra., 2012. "Evaluación in vitro del efecto del propóleo sobre *Microsporium canis*" .” Tesis de Grado, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.
- 15) Fernández, M. A., 2006. Enfermedades en peces. [En línea] <<http://www.aquanovel.com/enfermedades.html>>. [Consulta 1 de Septiembre 2013].
- 16) Fokt H., Pereira A., A. M. Ferreira A. Cunha Aguiar C. 2010. How do bees prevent hive infections? The antimicrobial properties of propolis. Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology A. Méndez-Vilas.

- 17)González, J. 2006. Peces tropicales. [En línea]
<https://www.geocities.com/jgonz/index.html> [Consulta 1 de Septiembre 2013].
- 18)Gutierrez E. 2011. “Actividad antibacterial y perfil químicos de propóleo mexicanos sobre cepas de *Pasteurella multocida* aislada de conejos”. Tesis de Maestria, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.
- 19)Hernández J. et.al. 2007. Sonoran propolis: Chemicals composition and antiproliferative activity on cancer cell lines. *Planta Med.*; 73:1469.1474.
- 20)Langvad, F. 1994. Saprolegnia in Norwegian Fish Farming. In: G. J. Mueller, ed., *Salmon Saprolegniasis*. Bonneville Power Administration, Div. Fish and Wildlife, Portland, OR. pp 188-201.
- 21)Lastres García, JL. 2002. Nuevos Sistemas Orales de Liberación Modificada. *Schironia*.
- 22)Londoño A. 2010. Estudio Comparativo de la actividad antifúngica de un extracto de propóleo mexicano y de tres plantas que *Apis mellifera* usa para su producción. Tesis de doctorado. Cuautitlán Izcalli Estado de México, México Instituto Tecnológico de Costa Rica.
- 23)López Zamora, Cristian Ismael, 2012. “Evaluación in vitro del efecto del propóleo sobre *microsporum gypseum*” Tesis de Grado, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.
- 24)Magaña Vera, Beatriz, 2001. Elaboración de comprimidos farmacéuticos. Tesis de Grado, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.
- 25)Mathiowitz Edith. 1999. *Encyclopedia of controlled drug delivery*. Vol 1 y 2. Ed. John Wiley and Sons, INC. USA pp 381-382, 1007-1034.

- 26) Monografías de formas farmacéuticas. Formas Farmacéuticas. En: Real Farmacopea Española. 3ª edición. Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo; 2005. Pp 645.
- 27) Navarro NM, Hernández MJ, Velázquez CCA. 2011. Propóleos, producto de la abeja para combatir infecciones. *Epistemus*, Número 10.
- 28) Padgett, D. E. 1984. Evidence for extreme salinity tolerance in saprolegniaceous fungi (oömycetes). *Mycologia* 76: 372-375.
- 29) Pasquel A. 2011. Control de la Saprolegnosis en ovas de Trucha Arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) aplicando un desinfectante químico. Tesis de grado. Universidad Técnica de Machala. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Escuela de Acuicultura.
- 30) Paxtron, C. G. M., Willoughby, L. G. 2000 Resistance of perch eggs to attack by aquatic fungi J. Fish Biol. 57:562-570.
- 31) Peña R. 2008. Estandarización en propóleos: antecedentes químicos y biológicos, *Cien. Inv. Agr.*; 35 (1): 17-26.
- 32) Salas J y Garrido C. 1997. Diccionario: Guía de enfermedades. [En línea] 3 de mayo 2005 <www.drpez.com><<http://drpez.com/diccionario/>> Consulta 6 de septiembre 2013.
- 33) Stevenson J. P. 1968. Manual de Cría de Trucha Arcoiris. *Panorama Acuicola* 5:22-23.
- 34) Tolosá I. Cañizares E. 2002. Obtención, caracterización y evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleo de Campeche *Ars Pharmaceutica*; 43:1-2: 187-204.

- 35) Torres, J., Fajardo C. 2011 Tratamientos profilácticos antisaprolegniasis para mejorar la sobrevivencia embrionaria en ovas de trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*), *Zoot Tropic.* 29:2.
- 36) Torto-Alalibo, T., Tian, M., Gajendrar, K. Waugh, Mark E., Expressional sequence tags from the oomycete fish pathogen *Saprolegnia parasitica* reveal putative virulence factors, *BMC Microbiol.* 5, 46:1-13.
- 37) Hexiang Wang, Tzi Bun Ng. 2002 "Isolation of an antifungal thaumatin-like protein from kiwi fruits" aDepartment of Microbiology, College of Biological Science, China Agricultural University, Beijing, China.
- 38) WHISLER, H. C. 1996. Identification of *Saprolegnia* ssp. Pathogenic in Chinook Salmon. In: G. J. Mueller editorial, Bonneville Power Administration, Portland, OR. p 58.
- 39) Ye, X.Y., Wang, H.X., Ng, T.B., 1999. First chromatographic isolation of an antifungal thaumatin-like protein from French bean legumes and demonstration of its antifungal activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 263, 1002–1013.
- 40) Zarco G, Rivero B, Duarte G, López A, Correa A, Rivero J. 2012. Composición Química de Propóleos Recolectados en la zona rural de México *Rev. Latinoamer. Quim.*; 39:232.
- 41) Zaror, L, Collado, L, Bohle, H, Landskron, E, Montaña, J, & Avendaño, F. (2004). *Saprolegnia parasitica* en salmones y truchas del sur de Chile. *Archivos de medicina veterinaria*, 36(1), 71-78.