



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

Evaluación del efecto antimicótico de
propóleos mexicanos contra
Cryptococcus neoformans

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Químico Farmacéutico Biólogo

PRESENTA:

Jorge Eduardo Pacheco Pérez

ASESOR:

M. en C. Betsabé Rodríguez Pérez

COASESOR: Dr. Tonatihu Alejandro Cruz Sánchez



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

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

ATN: LA. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
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 comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Evaluación del efecto antimicótico de propóleos mexicanos contra *Cryptococcus neoformans*.

Que presenta el pasante: Pacheco Pérez Jorge Eduardo
Con número de cuenta: 305053488 para obtener el Título de la carrera: Química Farmacéutico Biológica.

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 24 de Abril de 2017.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Q. Mario Arturo Morales Delgado	<i>Mario A. Morales D.</i>
VOCAL	M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez	<i>Ana Laura Vázquez Martínez</i>
SECRETARIO	M. en C. Betsabé Rodríguez Pérez	<i>Betsabé Rodríguez Pérez</i>
1er. SUPLENTE	Q.F.B. Leticia Cubillo Carrillo	<i>Leticia Cubillo Carrillo</i>
2do. SUPLENTE	Q.F.B. Verónica Ruiz Solorio	<i>Verónica Ruiz Solorio</i>

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

LMCF/cga*

Investigación realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM, proyecto IT200915 denominado “Desarrollo de productos con propóleo para su uso en la pasteurelosis del conejo, el distemper canino y la otitis canina”.

Este trabajo fue realizado en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campo 4, en las instalaciones del Laboratorio 6 de Microbiología de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria (UIM) a cargo del Dr. Tonatiuh A. Cruz Sánchez.



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar te agradezco a ti Dios, por ayudarme a terminar este proyecto, gracias por darme la fuerza, lucidez, inteligencia y paciencia para hacer este sueño realidad; por ponerme en esta maravillosa familia y por cuidarme y estar conmigo en cada momento de mi vida.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, que me brindó la oportunidad para realizar mis estudios de licenciatura; por haberme permitido formar parte de la matrícula de la FES Cuautitlán y por colocar en mi camino Maestros de excelencia.

A mi asesora la M. en C. Betsabé Rodríguez Pérez, por su confianza, por creer en mí desde el principio, por compartir su conocimiento y tiempo para la realización de este trabajo. Maestra, gracia por el rigor, su orientación y sobre todo su apoyo y amistad no solo en el servicio social y la tesis sino durante toda mi carrera.

Al Dr. Tonatiuh Alejandro Cruz Sánchez por darme la confianza y aceptarme en el proyecto; así como por permitirme formar parte del laboratorio 6 de microbiología de la UIM.

A los profesores que me marcaron en mi formación académica, que me inspiraron con sus conocimientos, habilidades y destrezas para superarme día a día, los admiro mucho y estoy agradecido con Dios por ponerlos en mi formación; gracias: Ana Laura Vázquez Martínez, Mario Arturo Morales Delgado, Leticia Cubillo Carrillo, Betsabé Rodríguez Pérez, Rosalba Bonilla Sánchez, Andrea Becerril Osnaya, Martha Patricia Zúñiga Cruz, Idalia Ávila Miyazawa, Ángel Martínez Sosa, Lidia Rangel Trujano y Alberto Natahliel Soto Guevara.

DEDICATORIA

A mis padres por haberme forjado como la persona que soy, con una vida apegada a Dios, en una familia unida y llena de valores; muchos logros se los debo a ustedes incluyendo este. Lupita hermosa gracias por siempre poner primero a tus tres hijos antes que a ti, por sacrificar tu vida y todo tu esfuerzo para que seamos personas de bien, por todas tus oraciones, tus consejos, tu sabiduría, eres la mejor Maestra, mamá y ser humano que conozco; mi más profundo agradecimiento, amor y respeto eres mi admiración y todo un ejemplo de vida, te amo mi querida maestra de valores. Giorgio, gracias por todo el apoyo que me has dado desde la infancia hasta ahora y porque siempre trabajaste para nosotros, por tantos desvelos que te cause y ahí seguías a mi lado, por siempre apoyar y respetar mis decisiones, por quitarte el pan de la boca y privarte de cosas para que a tus “cachorros” nunca les faltara nada, te amo papá.

A ti Erick, que eres un regalo de Dios, espero ser un buen ejemplo para ti, gracias por aguantar al hermano mayor y preocuparte por mí, te amo sigue adelante con todas tus metas y sabes que siempre estaré para ti.

A mis amigos: mamá grande y papá Lalo que admiro el amor que se tienen, son un ejemplo de vida; gracias por todo el apoyo, por esas plegarias que diario hacen para toda la familia, por siempre preocuparse por mi familia y por mí, por ser unos buenos consejeros y por siempre saber escuchar, los amo y gracias, gracias por todo lo que hacen por mí.

A ustedes abuelitas que ya están en el cielo, pilares de nuestra familia, no saben cómo admiro la vida que tuvieron las dos, llenas de superación; Lolita gracias por los consejos y todo tu cariño, Petris gracias por esas historias, por ser mi compañera de casa y por compartir esas pizzas; las amo gracias por siempre rezar por todos y cuidarnos desde allá arriba.

A mi otra mami, Silvia desde que tengo uso de memoria siempre has estado a mi lado; eres una excelente tía, eres mi mejor amiga gracias por siempre estar ahí para mí y apoyarme en todo; Javier y Silvia gracias por su presencia y cariño incondicional en los momentos más importantes de mi vida, los quiero mucho.

A mi tío Lalo y Adriana; excelentes tíos, compañeros de viaje y buenos amigos, gracias por su apoyo incondicional, cariño y atenciones que han tenido para conmigo; los quiero mucho y de todo corazón gracias.

A mi tía Lucha y Rogelio por toda la ayuda y el afecto que siempre me han manifestado, muchas gracias, los quiero mucho.

A ti Güera gracias por tu apoyo y por estar pendiente de mí, te quiero mucho.

A ti Ana Laura, por ser mi compañera de carrera y de vida, por toda tu comprensión y paciencia, por tomar mi mano en los momentos más difíciles y ser mi apoyo; doy gracias a Dios por la bendición de ponerte en mi camino, gracias por todo choco, te quiero mucho.

A mi tía Chío, Dianita, Fer, Karen y Carlitos ustedes son muy importantes en mi vida, gracias por todo su cariño.

A mi querida compañera Chewi; por todo tu amor, fidelidad e inocencia, por desvelarte conmigo estudiando y haciendo tareas, por alegrar mis días con todas tus ocurrencias, por estar a mi lado todo el tiempo, eres una perrita súper inteligente, doy gracias a Dios por tenerte en nuestras vidas; gracias por todo meme.

A todos mis familiares y amigos que a su forma me apoyaron y por cuestión de espacio no están en esta pequeña lista, gracias por todo su apoyo.

Contenido

Índice de imágenes.....	x
Índice de tablas.....	xii
Índice de gráficas.....	xiii
ABREVIATURAS.....	xiv
GLOSARIO.....	xv
1. RESUMEN.....	1
2. MARCO TEÓRICO.....	2
2.1 Propóleo.....	2
2.1.2 Historia.....	2
2.1.3 Evaluación de calidad.....	3
2.1.4 Composición química.....	4
2.1.5 Actividad biológica.....	5
2.1.6 Actividad antimicótica.....	6
2.2 Compuestos fenólicos.....	8
2.2.1 Biosíntesis.....	8
2.2.2 Importancia en la vegetación.....	10
2.3 Flavonoides.....	11
2.3.1 Biosíntesis.....	12
2.3.2 Funciones en la vegetación.....	12
2.3.3 Propiedades biológicas.....	14
2.4 <i>Cryptococcus neoformans</i>	14
2.4.1 Características generales.....	14
2.4.2 Serotipos.....	16
2.4.3 Ciclo de vida.....	16
2.4.3.1Vía de entrada.....	17
2.4.3.2Reservorio.....	17
2.4.4 Factores de virulencia.....	20

2.4.5 Epidemiología	21
2.4.6 Diagnóstico	21
2.5 Antimicóticos	24
2.5.1 Anfotericina B	26
2.5.2 Flucitosina	27
2.5.3 Antimicóticos azólicos.....	29
2.5.4 Fluconazol	30
3. JUSTIFICACIÓN	31
4. OBJETIVOS	32
5. HIPÓTESIS	32
6. METODOLOGÍA.....	33
6.1 Diagrama experimental	33
6.2 Recolección de propóleos mexicanos.....	34
6.3 Obtención del Extracto Etanólico de Propóleo (EEP)	34
6.4 Pruebas cualitativas	34
6.4.1 Detección de Fenoles	34
6.4.2 Detección de Flavonoides	35
6.5 Pruebas cuantitativas.....	35
6.5.1 Fenoles	35
6.5.2 Flavonoides	36
6.6 Prueba de difusión en agar	36
6.7 Prueba de CMI y CMF	36
7. RESULTADOS.....	37
7.1 Colecta y origen de los propóleos.....	37
7.2 Especificaciones organolépticas	38
7.3 Especificaciones químicas.....	39
7.3.1 Determinación cualitativa de fenoles	39
7.3.2 Determinación cualitativa de flavonoides	40

7.3.3 Determinación cuantitativa de fenoles.....	41
7.3.4 Determinación cuantitativa de flavonoides.....	42
7.4 Prueba de difusión en agar	44
7.5 Prueba de macrodilución para determinar la CMI y CFM.	46
8. ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN	49
9. CONCLUSIONES.....	53
10. PERSPECTIVAS DEL PROYECTO	54
11. REFERENCIAS	55
12. ANEXOS.....	58
Anexo 1. Preparación del EEP.....	58
Anexo 2. Prueba Cualitativa de Fenoles	59
Anexo 3. Prueba Cualitativa de Flavonoides	60
Anexo 4. Prueba Cuantitativa de Fenoles.....	61
Anexo 5. Prueba Cuantitativa de Flavonoides.....	64
Anexo 6. Prueba de difusión en agar	68
Anexo 7. Prueba de CMI y CFM, estandarizados por el CLSI.	71

Índice de imágenes

Imagen 1. Regiones apícolas en México.....	2
Imagen 2. Producción de polen y propóleo en México.....	3
Imagen 3. Propóleo en greña	4
Imagen 4. Estructura de algunos compuestos fenólicos.....	8
Imagen 5. Biosíntesis de fenoles y flavonoides.....	10
Imagen 6. Estructura de anillos en los flavonoides.....	11
Imagen 7. Flavonoide base (naringenina chalcona) y formación de flavonona.....	12
Imagen 8. Los flavonoides están presentes en la vegetación	13
Imagen 9. Efectos farmacológicos de algunos flavonoides.....	14
Imagen 10. Estructura celular de <i>Cryptococcus spp</i>	15
Imagen 11. Esquema de una levadura en proceso de gemación.....	15
Imagen 12. Cultivo de <i>Cryptococcus neoformans</i>	15
Imagen 13. Ciclo de vida del <i>Cryptococcus neoformans</i>	17
Imagen 14. Factores de virulencia para el desarrollo de <i>Cryptococcus sp</i>	20
Imagen 15. Tinción de tinta china para observar e identificar al <i>C. neoformans</i>	22
Imagen 16. Algoritmo diagnóstico para la identificación de especies de <i>Cryptococcus</i>	23
Imagen 17. Microorganismos patógenos comunes del reino de los hongos.....	24
Imagen 18. Mecanismo de acción de los antimicóticos.....	25
Imagen 19. Modelo de un poro formado por la Anfotericina B en la bicapa lipídica de la membrana	26
Imagen 20. Modo de acción de la flucitosina.....	28
Imagen 21. Mecanismo de acción de los azoles	29
Imagen 22. Determinación cualitativa de fenoles.....	39
Imagen 23. Determinación cualitativa de flavonoides.....	40
Imagen 24. Prueba de difusión en agar de los tres EEP (Morelos, Estado de México y Michoacán) con la cepa de <i>Cryptococcus neoformans</i> a una concentración de 5 mg/disco	45

Imagen 25. Diluciones para la prueba de CMI y CFM en un rango de 2.5 mg/mL a 0.0048 mg/mL.....	46
Imagen 26. Controles positivos y negativo de la prueba de CMI y CFM (izquierda), Resultados de la prueba de CMI y CFM para el extracto etanólico de propóleo de Michoacán	47
Imagen 27. Resultados del efecto con una concentración de 2.5 mg/mL (izquierda) y efecto con una concentración de 0.0048 (10), 0.0097 (9) y 0.0195 (8) mg/mL (derecha) para el EEP de Michoacán	47
Imagen 28. Reacción de óxido-reducción del ácido gálico	61
Imagen 29. Sistemas para la elaboración de la curva de ácido gálico	62
Imagen 30. Reacción de quelación del ion Al ³⁺ con la quercetina	64
Imagen 31. Sistemas para la elaboración de la curva con quercetina.	66
Imagen 32. Esquema para las diluciones del propóleo	71
Imagen 33. Preparación del inóculo de <i>Cryptococcus neoformans</i>	73
Imagen 34. Segundo paso de las diluciones de propóleo	74

Índice de tablas

Tabla 1. Composición del propóleo	5
Tabla 2. Principales actividades y componentes de propóleos del mundo	7
Tabla 3. Especies de aves en las que se han aislado especies de <i>Cryptococcus</i>	19
Tabla 4. Tipos de antimicóticos y grupos de químicos a los que pertenecen	25
Tabla 5. Apariencia de los propóleos en greña, así como de su extracto	37
Tabla 6. Resultados de las propiedades organolépticas de los propóleos en greña	38
Tabla 7. Resultados de prueba cualitativa de fenoles	39
Tabla 8. Resultados de prueba cualitativa de flavonoides	40
Tabla 9. Resultados de la cuantificación de fenoles totales en los extractos evaluados....	41
Tabla 10. Resultados de la cuantificación de flavonoides totales en los extractos evaluados.	42
Tabla 11. Resultados de la prueba de inhibición del crecimiento.....	44
Tabla 12. Concentraciones a evaluar en la prueba de CMI y CFM.....	46
Tabla 13. Resultados de la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Fungicida Mínima (CFM)	48
Tabla 14. Preparación de la curva de fenoles.....	61
Tabla 15. Preparación curva de flavonoides	65
Tabla 16. Preparación de las diluciones dobles seriadas de cada EEP	72

Índice de gráficas

Gráfica 1. Determinación cuantitativa de fenoles totales.....	41
Gráfica 2. Cuantificación de Flavonoides	42
Gráfica 3. Comparación de contenido de fenoles y flavonoides en los tres extractos	43
Gráfica 4. Promedio en mm de los halos de inhibición de los EEP frente a <i>C. neoformans</i>	44
Gráfica 5. Resultado de la CMI y la CFM.....	48
Gráfica 6. Curva para cuantificación de fenoles.....	62
Gráfica 7. Curva para la cuantificación de flavonoides	66

ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
AlCl ₃	Tricloruro de aluminio
°C	Grados Celsius
CLSI	Instituto de Normas Clínicas y de Laboratorio
CMF	Concentración Mínima Fungicida
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
CONABIO	Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.
EEP	Extracto Etanólico de Propóleo
FeCl ₃	Cloruro férrico
FESC	Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
INEGI	Instituto Nacional de Geografía e Informática
IV	Intravenosa
KMnO ₄	Permanganato de potasio
Mg	Miligramo
mL	Mililitro
µg	Microgramo
µL	Microlitro
Na ₂ CO ₃	Carbonato de sodio
NOM	Norma Oficial Mexicana
Nm	Nanómetro
PAL	Fenilalanina Amonio Lipasa
Pb(C ₂ H ₃ O ₂) ₂	Acetato de plomo
SAGARPA	Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
ppm	Partes por millón
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México

GLOSARIO

Antocianinas: Flavonoides pigmentados responsables de la mayoría de los colores de las flores y los frutos, por ello son importantes en la polinización y en la dispersión de semillas. Son glicósidos con un azúcar en posición 3.

Cera: Sustancia grasa segregada por las glándulas céricas de las obreras jóvenes. Es utilizada por las abejas como material de construcción de las celdillas de la colmena.

Fenoles: Son compuestos con un grupo –OH unido a un anillo de benceno (también llamado hidroxibenceno o ácido carbólico). Como metabolitos secundarios de las plantas, son compuestos orgánicos que contienen al menos un grupo hidroxilo unido a un anillo aromático, que puede contener o no otro grupo funcional.

Flavonoides: Es el término genérico con que se identifica a una serie de metabolitos secundarios de las plantas. Derivados de la estructura 2-fenilcromen-4-ona (2-fenil-1,4-benzopirona).

Flavonoles: Son una clase de flavonoides que tienen como columna vertebral a la 3-hidroxi-flavona. Su diversidad se deriva de las diferentes posiciones de los grupos fenólicos.

Isoflavonas: También llamadas isoflavonoides, son un grupo de flavonoides en los que la posición del anillo aromático (anillo B) cambia a la posición 3. Derivados de la estructura 3-fenilcromen-4-ona (3-fenil-1,4-benzopirona).

Metabolitos secundarios: Compuestos orgánicos derivados del metabolismo secundario de las plantas que no parecen tener una función directa en el crecimiento y desarrollo de éstas. Se diferencian de los metabolitos primarios en que tienen una distribución restringida en el reino vegetal y se sintetizan en pequeñas cantidades.

Propóleo: Es una sustancia viscosa de color anaranjado a rojizo, e impermeable al agua que cubre algunas yemas de árboles y coníferas, con el cual las abejas tienden a tapar los intersticios de sus nidos.

Resina: Secreción orgánica que producen muchas plantas, particularmente los árboles de tipo conífera.

1. RESUMEN

El propóleo es una sustancia resinosa recolectada por las abejas (*Apis mellifera*) a partir de diferentes árboles, flores y arbustos.

Sus propiedades medicinales han mantenido su popularidad a través de los años debido a que posee actividad antimicótica, antibacteriana, antiviral y antiparasitaria, mostrando variación en su actividad biológica dependiendo de su origen geográfico y la cantidad de metabolitos en su composición.

En México, la información respecto a la actividad de este producto es muy limitada, aunque en los últimos años en el Laboratorio 6 de Microbiología en la UIM de la FES Cuautitlán, Campo 4, se han hecho múltiples investigaciones en cuanto al uso del propóleo, lo cual ha servido como un gran soporte en la investigación del trabajo realizado.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad antimicótica de extractos etanólicos de propóleos (EEP) de tres diferentes lugares de la República Mexicana (Michoacán, Morelos y El Estado de México) sobre el crecimiento de *Cryptococcus neoformans*.

Las tres muestras presentaron colores marrón-verdoso, aromáticos, con sabor amargo, trozos irregulares y de consistencia maleable.

Se realizó la cuantificación de fenoles y flavonoides, así el EEP de Morelos tuvo mayor concentración de estos metabolitos: 20% de fenoles y 15% de flavonoides, seguido por la muestra del Estado de México con 15% de fenoles y 11% de flavonoides; mientras que el EEP de Michoacán presentó los valores más bajos con 8% de fenoles y 4% de flavonoides

En cuanto a la actividad antimicótica, la muestra de Morelos presentó una CMI de 0.0781 mg/mL y una CFM de 0.3125 mg/mL, la del Estado de México tuvo una CMI de 0.1562 mg/mL y una CFM de 0.625 mg/mL y Michoacán presentó una CMI de 0.3125 y una CFM de 1.25 mg/mL.

Con estos datos se demuestra que la concentración de fenoles y flavonoides se relaciona con la actividad antimicótica, este trabajo demuestra que los extractos etanólicos de propóleos mexicanos podrían ser utilizados como un tratamiento alternativo en micosis causadas por *Cryptococcus neoformans* ya que se logró un efecto fungicida.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Propóleo

2.1.2 Historia

La apicultura en México tiene una gran importancia socioeconómica y ecológica, ya que es considerada como una de las principales actividades pecuarias generadora de divisas. Generalmente esta actividad se asocia únicamente con producción de miel, polen, jalea real y propóleos; sin embargo, las abejas son fundamentales para un equilibrio del medio ambiente ya que las abejas al obtener el alimento de las flores fomentan en las plantas la capacidad de fecundarse. Lo anterior se conoce como polinización cruzada, con ésta, las plantas generan el oxígeno suficiente para la vida y además, aumentan el rendimiento en los cultivos, lo que favorece un incremento en alimentos de origen vegetal, materia prima textil, e insumos agropecuarios.

En México, la CONABIO reporta que hay 26 495 especies de plantas, de las cuales 786 se destinan para la alimentación y 1 580 como insumos para la industria; el 80% depende de un polinizador para su producción. Por su parte, Investigadores de la UNAM identificaron 645 especies de plantas comestibles aprovechadas donde el 86% dependen de la polinización y estimaron el valor de la polinización en 43 mil millones de pesos, ver Imagen 1 (Pico, 2015).



Imagen 1.Regiones apícolas en México

El cuidado y aprovechamiento de los productos de las abejas en México, se remonta a épocas prehispánicas donde las diferentes culturas existentes tales como los Mayas, Tarascos, Lacandones, Olmecas, entre otros; cultivaban a las abejas sin aguijón (Meliponinos), con fines alimenticios, medicinales y religiosos.

La apicultura tecnificada se inició aproximadamente en el año 1920. La apicultura moderna se desarrolla a partir de las primeras exportaciones de miel alrededor de 1950, para estas fechas se establecen dos regiones productivas en México (centro y sur).

Se ha incrementado la demanda en el mercado mundial de propóleo, debido a sus características antimicrobianas, antioxidantes, antiinflamatorias y cicatrizantes, entre otras y en la imagen 2 se observa el desarrollo de la explotación de estos productos.

Los principales países productores de propóleo en el mundo son: China, Brasil, Argentina, Cuba, Chile, Uruguay y Canadá, así como, los países importantes que captan dicha producción son: Dinamarca, Francia, Alemania, Hungría, Ucrania y Estados Unidos de Norte América (Tolosa, 2002).

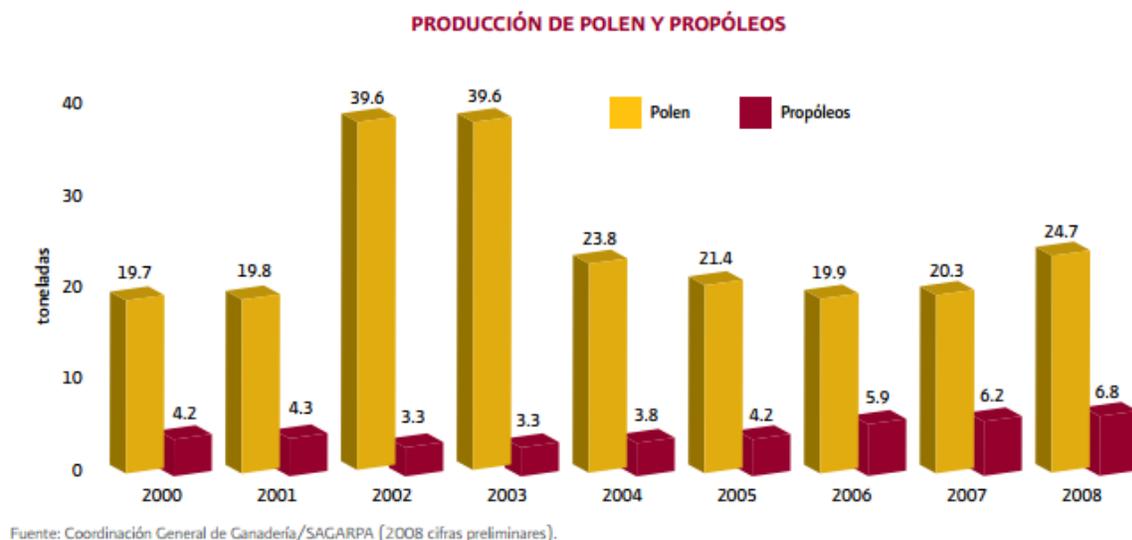


Imagen 2. Producción de polen y propóleo en México

2.1.3 Evaluación de calidad

Las múltiples y variadas propiedades beneficiosas para la salud del propóleo, que dependen de sus componentes, justifican la necesidad de una correcta evaluación de su calidad, y si bien distintos países disponen de parámetros oficiales para dicha evaluación, son escasos los ensayos de que se disponen para medir su actividad biológica. Para que la calidad de un propóleo se considere buena debe cumplir los siguientes requisitos:

1. Estar libre de contaminantes tóxicos.

2. Contener bajos porcentajes de cera, materia insoluble y cenizas.
3. Definir su procedencia botánica para determinar el tipo de compuestos activos.
4. Tener contenidos elevados de metabolitos secundarios como compuestos fenólicos y flavonoides.

La evaluación de la calidad va desde la inspección visual de sus características físicas y organolépticas (aspecto, consistencia, sabor, origen, color u olor), análisis químico y evaluación de la actividad antimicrobiana.

Los estándares oficiales utilizados para la caracterización y evaluación de la calidad de un propóleo están depositados en las regulaciones establecidas por las autoridades sanitarias propias de algunos países, la mayoría de los estándares se refieren al producto en bruto y en ocasiones a sus extractos, en el caso de Cuba que realiza evaluación para tintura y extracto blando.

Los estudios analíticos realizados por los países que cuentan con una normatividad respecto a la calidad del propóleo están basados en la determinación de sus atributos sensoriales y propiedades fisicoquímicas y en algunos casos, actividad antimicrobiana (Arbouret-Grand, 1994).

2.1.4 Composición química

Su composición química es bastante compleja y depende básicamente de las fuentes vegetales donde se originaron y de la función específica dentro de la colonia, por ello puede presentar consistencia viscosa; de color verde, pardo, castaño, rojizo e incluso puede ser negro, dependiendo de su origen botánico (Imagen 3).



Imagen 3. Propóleo en greña

Básicamente se compone de resinas, cera de abeja, aceites esenciales, polen y de materiales orgánicos y minerales, como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Composición del propóleo

COMPOSICIÓN	(%)	COMPUESTOS, CARACTERÍSTICAS Y OBSERVACIONES
Resinas	50-55	Flavonoides, ácidos fenólicos y ésteres.
Ceras	30-35	Mayoría cera de abeja, también de origen vegetal
Aceites esenciales	5-10	Formado principalmente por terpenoides, volátiles
Ácidos grasos	5	La mayoría proceden de la cera y el resto dependen del origen botánico
Polen	5	Proteínas del polen y aminoácidos libres. Predominan arginina y prolina
Otros compuestos orgánicos y minerales	5	14 oligoelementos Fe y Zn son los más abundantes, otros: Au, Ag, Cs, Hg, K, Sb, entre otros Cetonas Lactonas Quinonas Esteroides Ácido benzoico y ésteres Vitaminas: B1, B2, B3, B6. Pequeñas cantidades procedentes principalmente del polen Azúcares

(Ávalos, 2009).

Algunos autores plantean la existencia de componentes con actividad biológica y se señalan que entre los principales son del tipo flavonoide, tales como, las flavonas, flavonoles y las flavononas. Se han reportado alrededor de 38 flavonas, 12 derivados del ácido benzoico, 14 derivados del alcohol cinámico y el ácido cinámico, 12 componentes entre alcoholes, cetonas y fenoles, 7 terpenos, 11 esteroides, 7 azúcares y 2 aminoácidos (Farré, 2004).

2.1.5 Actividad biológica

Una de las propiedades más importantes del propóleo es su actividad antimicrobiana, la cual se le atribuye fundamentalmente a los flavonoides (Tolosa, 2002).

El propóleo como agente curativo tiene una historia ancestral que data desde Aristóteles. Sus propiedades antimicrobianas están bien documentadas, por ejemplo, la flavona pinocembrina es activa contra gran variedad de bacterias y hongos.

La quercetina, es una flavona con actividad antiviral que fortalece los capilares; así como tener gran capacidad antioxidante. Otros flavonoles y flavononas del propóleo tienen actividad antiinflamatoria, espasmolítica, anestésico tópico, cicatrizante de úlceras

gástricas, y como es esencial para activar la vitamina C, se relaciona con la prevención de escorbuto.

Así mismo, el propóleo potencializa los antibióticos, inhibe la aglutinación eritrocitaria, es útil en quemaduras, heridas, afecciones de las encías, gripe y hemorroides. Sus ácidos fenólicos tienen propiedades antidiabéticas e inhiben selectivamente las células tumorales del melanoma (Ramírez, 2004).

Los flavonoides (quercetina, apigenina, galangina, principalmente) y los ácidos fenólicos (cafeico, isoferúlico, cinámico y benzoico), además de ser tóxicos para las levaduras, inhiben la actividad enzimática de la hialuronidasa y el ácido caféico y la actividad de la dihidrofolato reductasa, podrían explicar la similitud entre algunos de sus efectos y los de algunos antiinflamatorios no esteroideos (Farré, 2004).

En la Tabla 2 se muestran las principales actividades del propóleo de acuerdo a las investigaciones de diferentes autores a nivel mundial, considerando los países de mayor producción de propóleo.

2.1.6 Actividad antimicótica

Los propóleos centroeuropeos (Alemania, Francia y Austria), con composiciones cualitativas similares y predominio del ácido trans-p-cumárico, muestran actividad frente a *Candida albicans* mientras que los mediterráneos (Bulgaria, Turquía, Grecia y Argelia), que contienen flavonoides, ésteres del ácido caféico y ácidos ferúlicos, presenta menor actividad antimicótica.

Estudios sobre la incidencia de la paracoccidiomicosis en América Latina, sugieren que, independientemente de su origen geográfico, los macrófagos estimulados con propóleo aumentan su actividad antimicótica. El propóleo muestra, en distintos grados, efectos fungicidas frente a numerosas especies como *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Ascospaera apis* y *Plasmopara vitico*. La mayor inhibición observada, 50% en todas las especies estudiadas, corresponde a una concentración de propóleo del 4% y los microorganismos más afectados son la *Alternaria alternata* y el *Penicillium digitatum*.

El diluyente del propóleo; aceite, etanol, propilenglicol o glicerina también influye en su actividad antimicótica (Farré, 2004).

En México se han realizado estudios del efecto antimicótico contra cepas de *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans*, indicando que el ácido caféico, los flavonoides y los ésteres fenólicos son los principales responsables de la actividad biológica del producto provocando los cambios en la morfología del hongo (Quintero, 2008; Londoño, 2010).

Tabla 2. Principales actividades y componentes de propóleos del mundo.

Actividad	Propóleos				Microorganismo sobre el que actúan / Acción
	Europa	Brasil	Cuba	México	
Anti bacteriana	Flavononas, flavonas, ácidos fenólicos y sus ésteres	Ácido p-cumárico prenilado, diterpenos	Benzofenonas preniladas	Ácidos fenólicos	<i>Bacillus larvae</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>M. tuberculosis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. sobrinus</i> , <i>S. mutans</i> , <i>S. cricetus</i> , <i>S. cerevisiae</i> , <i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> , <i>Bacteroides nodosus</i> , <i>K. pneumoniae</i>
Anti fúngica y antiviral	Flavonoides	Prenilados y benzopironas	Isoflavonoides	Pinocebrina	<i>C. albicans</i> , <i>C. neoformans</i> , <i>A. fumigatus</i> , <i>M. canis</i> , <i>Alternaria alternata</i> , <i>Fusarium</i> sp. VIH-1, virus de Aujeszky, herpes simple tipo 1 y 2.
Anti parasitaria	No evaluado	No evaluado	No evaluado	No evaluado	<i>Giardia lamblia</i> , <i>Trichomonas vaginalis</i> , <i>Eimeria magna</i>
Anti cancerígena	No evaluado	Ácido p-cumárico prenilado, diterpenos, benzofuranos	Benzofenonas preniladas	Xanthomicrol, galangina, acacentina, crisina	La acción moduladora en macrófagos, estimulación lítica de células NK contra células tumorales, aumento de citoquinas proinflamatorias, expresión y la producción de Th1 y Th2 (IL-4 e IL-10).
Anti proliferativa	Galangina, flavonoides y ácido cinámico	No evaluado	No evaluado	Pinocebrina, crisina	
Anti oxidante	Flavonoides, ácidos fenólicos y sus ésteres	Ácido p-cumárico prenilados, flavonoides	No evaluado	Galangina	Acción comparable a la Vitamina E, minimizando la peroxidación lipídica y el efecto de los radicales libres.
Cicatrizante	No evaluado	No evaluado	Flavononas (glucósidos) Metoxi-flavonoides	No evaluado	Intervención de estos compuestos a nivel de mediadores de la inflamación.

(Alves, 2011).

2.2 Compuestos fenólicos

Son compuestos con un grupo –OH unido a un anillo de benceno (también llamado hidroxibenceno o ácido carbólico).

Los fenoles se nombran como compuestos aromáticos, utilizando el sufijo –fenol como el nombre principal.

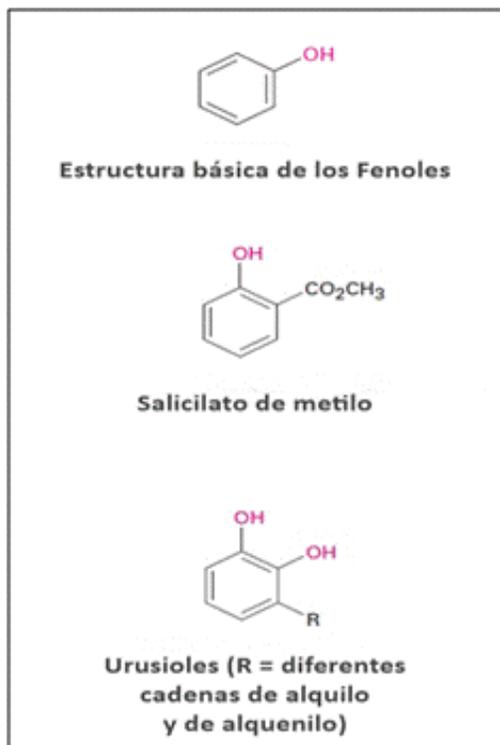


Imagen 4. Estructura de algunos compuestos fenólicos.

Fuente: McMurry 2012

2.2.1 Biosíntesis

Los compuestos fenólicos de las plantas forman un grupo químicamente heterogéneo de unos 10 000 compuestos. Algunos son solubles sólo en disolventes orgánicos, otros son ácidos carboxílicos y glicósidos solubles en agua, mientras que otros son grandes polímeros muy insolubles.

Los compuestos fenólicos de las plantas son biosintetizados en diferentes rutas, por ello, constituyen un grupo heterogéneo desde un punto de vista metabólico. Existen tres rutas básicas implicadas: 1) la ruta del ácido shikímico, 2) la ruta del ácido malónico y 3) la ruta del ácido mevalónico. La ruta del ácido shikímico es responsable de la biosíntesis de la

mayoría de los fenoles de las plantas. La vía del ácido malónico, aunque es una fuente importante de fenoles en hongos, es un poco menos empleada en plantas superiores. Por ejemplo, en la biosíntesis de tetrahidrocannabinol (THC) en *Cannabis sativa*, y las antraquinonas presentes en plantas del género Aloe.

La ruta del ácido shikímico convierte los precursores de carbohidratos derivados de la glicólisis y de la ruta de las pentosas fosfato en aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptofano). Uno de los intermediarios de la ruta es el ácido shikímico, que ha dado su nombre a toda la serie de reacciones (McMurry, 2012).

La mayor parte de los compuestos fenólicos de las plantas derivan de la fenilalanina por la eliminación de una molécula de amonio para formar ácido cinámico. Esta reacción es catalizada por la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL), que está situada en un punto de ramificación entre el metabolismo primario y secundario por lo que la reacción que cataliza es una importante etapa reguladora en la formación de muchos compuestos fenólicos.

Las reacciones posteriores a la catalizada por PAL, son básicamente adiciones de más grupos hidroxilo y otros sustituyentes. Los ácidos trans-cinámico y p-cumárico se metabolizan para formar ácido ferúlico y ácido caféico cuya principal función es ser precursores de otros derivados más complejos: cumarinas, lignina, taninos, flavonoides e isoflavonoides.

Los ácidos cinámico y cumárico, así como sus derivados, son compuestos fenólicos simples llamados fenilpropanoides por contener un anillo de benceno (C6) y una cadena lateral de tres carbonos (C3). Los fenilpropanoides son unidades básicas para la formación de compuestos fenólicos más complejos (Imagen 5) (García, 2009).

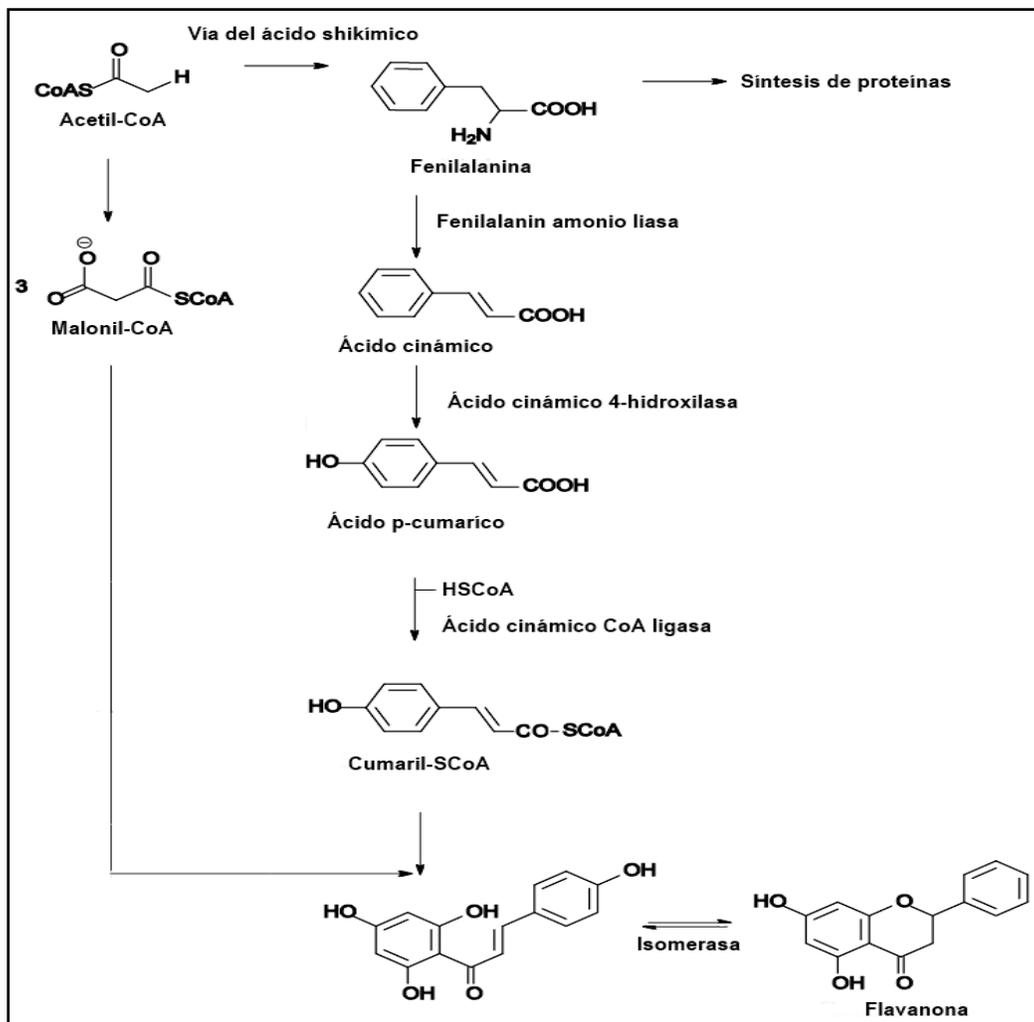


Imagen 5. Biosíntesis de fenoles y flavonoides

2.2.2 Importancia en la vegetación

La mayoría de los fenoles se encuentran formando parte de algunas estructuras celulares de las plantas y árboles, mientras que otros se forman como productos del metabolismo celular o son producidos por algunos vegetales como compuestos bactericidas. En general su presencia en las plantas se debe a su actividad antioxidante, su capacidad de unir especies con oxígeno activo y especies electrófilas, la capacidad de inhibir la nitrosación y de quelar iones metálicos, su potencial de auto oxidación y su capacidad de modular ciertas actividades enzimáticas en las células (Devlin, 2006).

Los fenoles se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, y sirven como intermediarios en la síntesis industrial de productos tan diversos como adhesivos y antisépticos.

Ejemplo de la presencia de fenoles en la naturaleza son: el fenol (con propiedades desinfectantes), se encuentra en el alquitrán de hulla y el ácido o-hidroxibenzoico (ácido salicílico), del que se deriva la aspirina, puede obtenerse de la corteza de sauce. Compuestos fenólicos como: timol, anetol, eugenol, vainillina e isoeugenol son responsables de los olores del tomillo, el anís, el clavo, la vainilla y la nuez moscada, respectivamente y los urusioles son los constituyentes alergénicos del roble venenoso y de la hiedra venenosa (McMurry, 2012).

2.3 Flavonoides

El término flavonoides denota un grupo muy amplio de compuestos polifenólicos caracterizados por una estructura benzo- γ -pirano, los cuales están ampliamente distribuidos en el reino vegetal y se encuentran de forma universal en las plantas vasculares, en forma de glicósidos.

Químicamente, estas sustancias son de naturaleza fenólica y se caracterizan por poseer dos anillos aromáticos bencénicos unidos por un puente de tres átomos de carbono, con la estructura general C₆-C₃-C₆, los cuales pueden formar o no un tercer anillo.

Los anillos son denominados A, B y C; los átomos de carbono individuales son referidos por un sistema numérico, el cual utiliza números ordinarios para los anillos A y C y números con apostrofe para el anillo B (Imagen 6). Los flavonoides naturales suelen presentar al menos tres hidroxilos fenólicos y se encuentran generalmente combinados con azúcares en forma de glicósidos, aunque también se presentan con relativa frecuencia como agliconas libres.

Varios subgrupos de flavonoides son clasificados de acuerdo con la sustitución del anillo C. En esta clasificación son de suma importancia el estado de oxidación del anillo heterocíclico y la posición del anillo B (Cartaya, 2001).

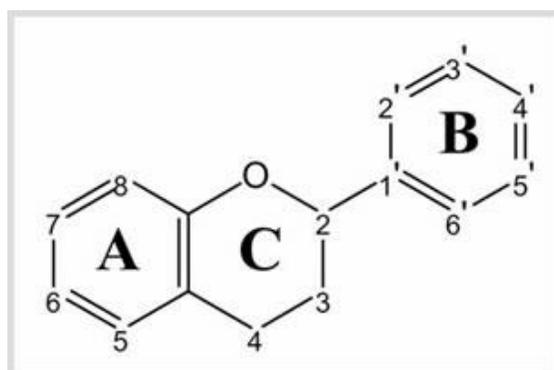


Imagen 6. Estructura de anillos en los flavonoides

2.3.1 Biosíntesis

Como ya se mencionó en la biosíntesis de los compuestos fenólicos, la ruta de la biosíntesis de flavonoides está íntimamente relacionada. La primera etapa consiste en la condensación de 3 moléculas de malonil-CoA con una molécula de p-cumaril-CoA. Esta reacción está catalizada por chalcona sintasa y da lugar a naringenina chalcona, precursor de los flavonoles y antocianinas. La misma condensación catalizada por la estilbeno sintasa conduce a la formación de estilbenos implicados en el mecanismo de defensa de las plantas frente a patógenos (Zeiger, 2006).

El primer flavonoide sintetizado por la vía del ácido shikímico es una chalcona, cuyo esqueleto es un anillo bencénico unido a una cadena propánica que está unida a su vez a otro anillo bencénico. En la mayoría de los flavonoides la cadena de reacciones continúa, por lo que la cadena carbonada que une los anillos aromáticos se cicla por acción de una enzima isomerasa, creando una flavonona (Imagen 7).

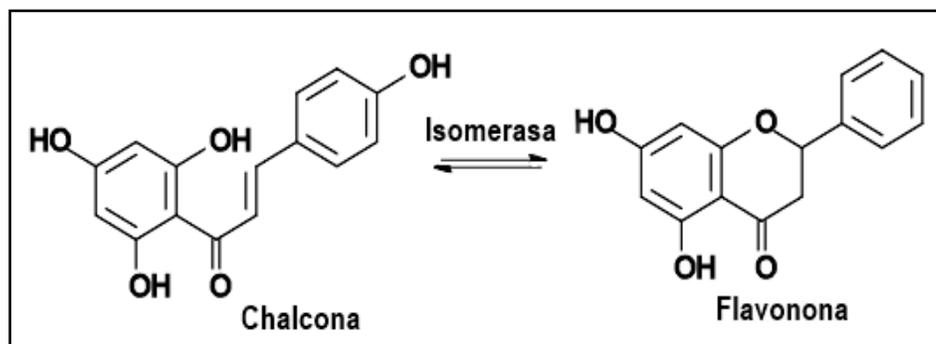


Imagen 7. Flavonoide base (naringenina chalcona) y formación de flavonona

2.3.2 Funciones en la vegetación

Los flavonoides son importantes para el desarrollo normal de las plantas; estos se encuentran localizados en la membrana del tilacoide de los cloroplastos, son utilizados en la vía de expresión de dos enzimas multigénicas: la fenilalanina amonio liasa (FAL) y la chalcona sintasa (CHS) y constituyen un grupo de sustancias colorantes importantes en las plantas.

Las funciones de los flavonoides en las plantas se pueden resumir en tres grupos: papel de defensa, papel de señal química y efecto sobre las enzimas. Los flavonoides juegan un papel en la defensa de las plantas frente a agentes agresores externos. Entre estos agentes se puede mencionar la radiación UV de los rayos solares, los microorganismos tanto bacterias,

como hongos e insectos y otros animales herbívoros, las otras plantas (efecto alelopático) y el entorno (medio ambiente agresivo) (Zeiger, 2006).

Los flavonoides inhiben una numerosa variedad de enzimas entre las que se encuentran: hidrolasas: β -glucoronidasa, hialuronidasa, fosfatasa alcalina, aril-sulfatasa, ATPasa, H^+ de las membranas lisosomal y granular; liasas: DOPA decarboxilasa; transferasas: catecol o metiltransferasa; hidroxilasas: aril-hidroxilasa; oxidoreductasas: aldosa reductasa y quinonas: hexoquinasas.

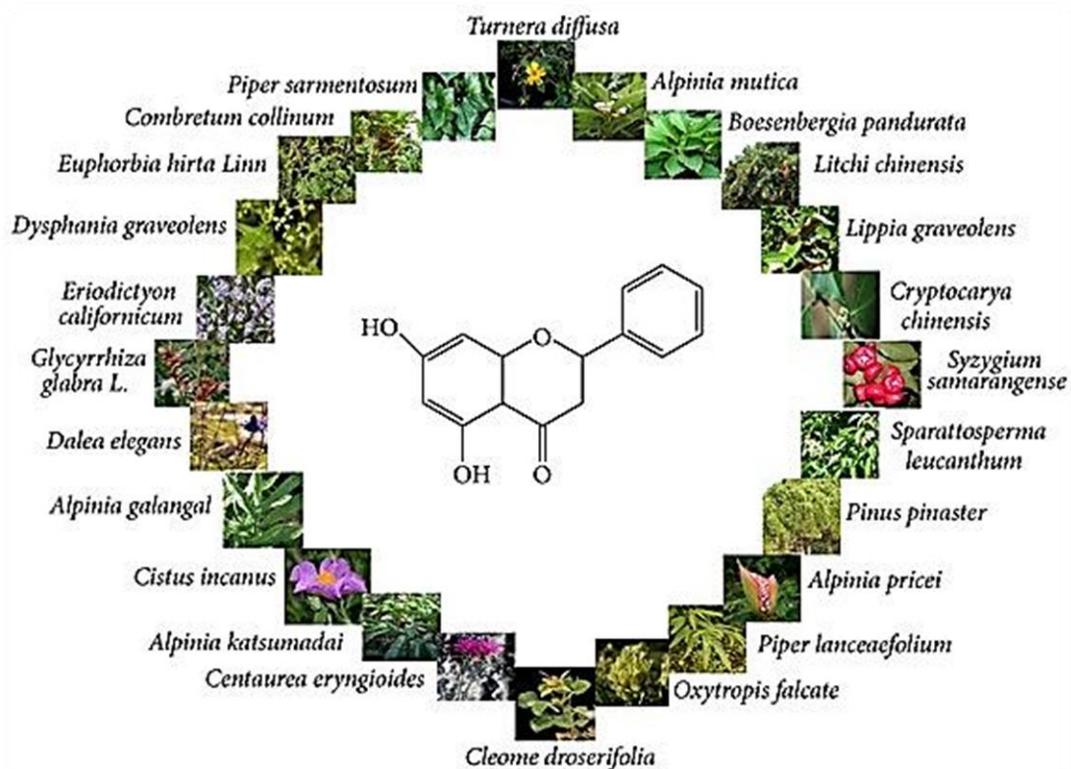


Imagen 8. Los flavonoides están presentes en la vegetación (Rodríguez, 2015)

2.3.3 Propiedades biológicas

En su relación con el hombre, los flavonoides presentan una serie de actividades farmacológicas, dependiendo de ciertas características de su molécula (Imagen 9)

Efectos	Flavonoide
Antineoplásico	quercetina, kaemferol, fisetina
Cardiotónicos	3-metil-quercetina
Disminuyen la fragilidad capilar	rutina, quercetina, naringenina
Antitrombóticas	tangeretina, hesperidina, rutina
Disminución del colesterol	liquiritigenina
Protección y regeneración hepática	silimarina, apigenina
Antiulcéricos	Kaemferol, quercetina
Antimicrobianos	quercetina, baicalina
Antibacterial	crisina, rutina
Antiviral	crisoeriol
Antifúngica	cloroflavonina, apigenina
Antiinflamatorios	hesperidina, luteolina, quercetina
Analgésico	hesperidina
Anticancerígeno	quercetina

(Cartaya, 2001).

Imagen 9. Efectos farmacológicos de algunos flavonoides

2.4 *Cryptococcus neoformans*

2.4.1 Características generales

Los criptococos son levaduras redondas u ovals (3.5-8µm), poseen una cápsula de naturaleza polisacaroídea (Imagen 10) que le confiere virulencia, protegiendo al hongo de la fagocitosis, y cuyo tamaño varía dependiendo de la cepa y medio de cultivo que se utilice para aislar la levadura que se reproducen por gemación única, con un cuello estrecho entre célula madre y la hija (Imagen 11).

Crece muy bien en todos los medios de cultivo formando colonias mucosas, aunque con el tiempo pueden aparecer secas; el color es muy variable (crema, ocre, rosa, amarillo), virando a tonos más oscuros con la edad (Imagen 12). Las cepas que poseen una cápsula muy pequeña, forman colonias similares a las del género *Candida* (Tsuji, 2005).

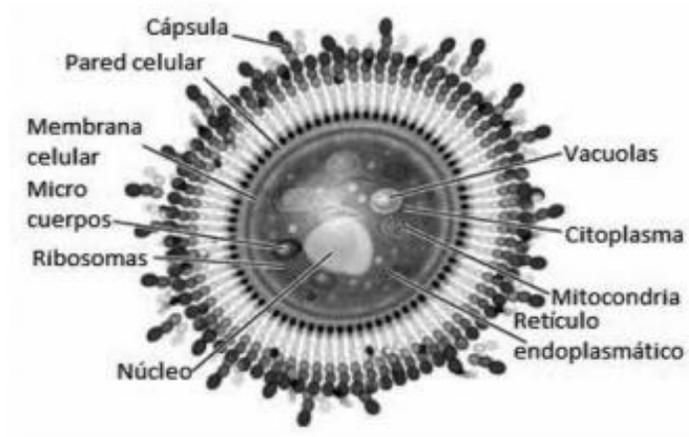


Imagen 10. Estructura celular de *Cryptococcus* spp

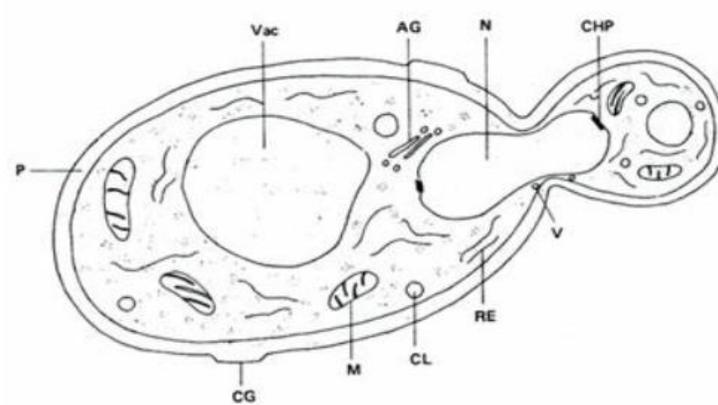


Imagen 11. Esquema de una levadura en proceso de gemación. (P, pared celular; Vac, vacuola; CG, cicatriz de gemación; M, mitocondria; CL, cuerpo lipídico; AG, aparato de Golgi; RE, retículo endoplasmático; V, vesícula; CHP, corpúsculo huso-polar; N, núcleo).



Imagen 12. Cultivo de *Cryptococcus neoformans*

Tienen metabolismo aerobio, por lo que no son fermentadoras, producen ureasa y utilizan varios hidratos de carbono. Las distintas especies de criptococos se diferencian entre sí por una serie de características: crecimiento a 37° C, asimilación de la sacarosa, lactosa, galactosa, melobiosa, celobiosa, rafinosa, trealosa y dulcitol, utilización de KNO₃ y producción de ureasa y fenil-oxidasa.

Dentro de *C. neoformans*, según la composición de la cápsula, se han descrito al menos cuatro serotipos distintos, denominados A, B, C y D. Los serotipos A y D se identifican como *C. neoformans var. neoformans* y los B y C como *C. neoformans var. gattii* (Mazuelos, 2010).

2.4.2 Serotipos

Existen diferencias entre las dos variedades, tanto desde el punto de vista patogénico como de distribución geográfica, de tal forma que *C. neoformans var. neoformans* se ha relacionado con la infección en los pacientes inmunodeprimidos, siendo de distribución mundial, mientras que el *C. neoformans var. gattii* se ha descrito en infecciones de pacientes inmunocompetentes y su distribución está más restringida a países tropicales y subtropicales.

También se diferenciaban estas variedades por sus características bioquímicas: los tipos B y C, asimilan los ácidos 1-málico, fumárico y succínico, producen pigmento sobre agar niger, de color verde, y sobre agar con L-cavanina-glicina-azul de bromotimol, y asimilan la glicina como única fuente de carbono. Los serotipos A y D, por el contrario, no presentan estas reacciones. Existen también diferencias genéticas por hibridación del DNA. La distribución en la naturaleza es asimismo diferente: los tipos A y D se asocian con las deyecciones de palomas y otros pájaros, mientras que los otros dos tipos B y C se han encontrado en distintas especies de eucaliptos (Tsuji, 2005).

2.4.3 Ciclo de vida

La Criptococosis pulmonar se inicia por inhalación de propágulos, los cuales pueden estar compuestos de las levaduras, y también de las esporas o basidiosporas (fase teleomórfica); cualquiera de estas estructuras llega hasta los alvéolos, atravesando las vías respiratorias para generar el primo-contacto pulmonar, que la mayoría de las veces cursa de manera subclínica o asintomática (Imagen 13).

C. neoformans prolifera con rapidez si no existe una adecuada defensa celular, en especial células mononucleares; esto explica por qué los pacientes con linfomas y el SIDA son muy susceptibles a la enfermedad. Si el proceso infeccioso no se detiene, los microorganismos se diseminan con facilidad por vía linfática y hematógena, especialmente hacia el sistema

nervioso central (SNC), en donde el líquido cefalorraquídeo (LCR) es más deficiente en un factor fungistático denominado factor anticriptocócico, por lo cual puede evadir con habilidad la respuesta inmune (Tsuji, 2005).

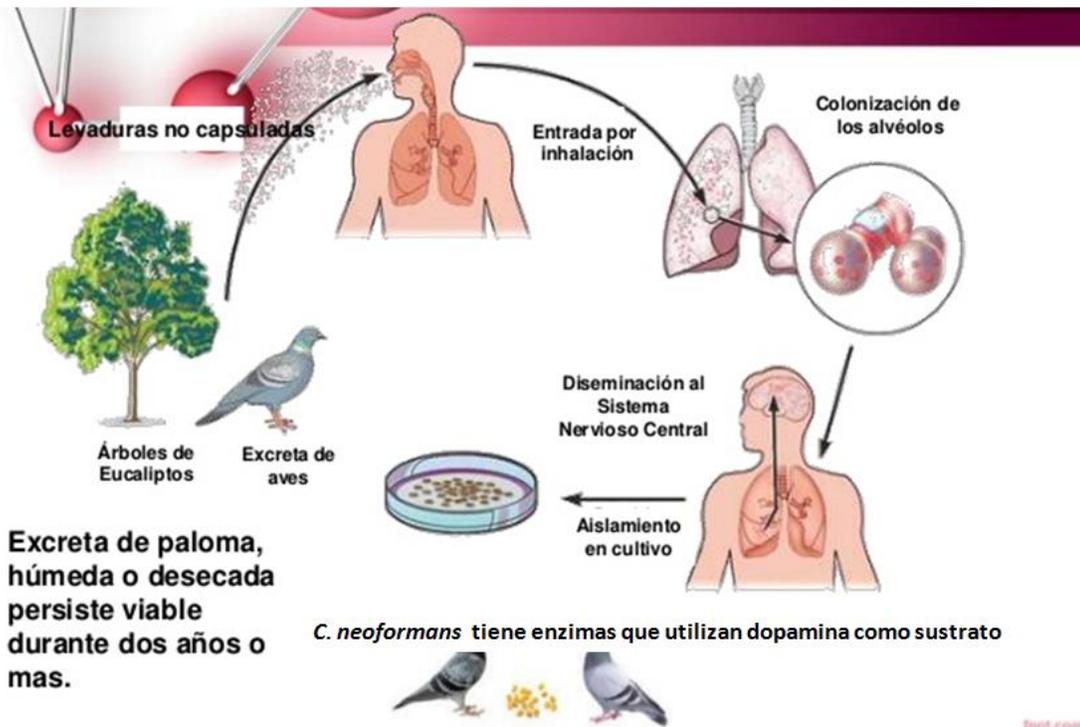


Imagen 13. Ciclo de vida del *Cryptococcus neoformans*

2.4.3.1 Vía de entrada

Casi siempre es respiratoria, a través de propágulos; estos pueden estar formados por levaduras (en desecación), así como esporas (basidiosporas); sin embargo, hay reportes de casos cutáneos y también pueden ingresar por vía oral (frutos, leche, entre otras), pero la lisozima salival y el pH ácido lo inactivan (Mazuelos, 2010).

2.4.3.2 Reservorio

El papel de la paloma como portadora de hongos patógenos fue establecido por Emmons en 1955, el cual aisló *C. neoformans* de las excreciones de palomas urbanas (*Columba livia*), siendo el primero en establecer la relación existente, y actualmente consolidada, entre el microorganismo y las heces de estas aves. Estudios posteriores realizados por el propio Emmons y por otros investigadores muestran que las excreciones viejas de palomas son la fuente conocida más abundante de dicho microorganismo.

Tras el descubrimiento de Emmons, investigadores de casi todo el mundo han demostrado que las deposiciones de diversas aves son un importante reservorio de *C. neoformans*.

Como se mencionó anteriormente, el hábitat principal de *C. neoformans* es el suelo contaminado con excremento de paloma, aunque también se ha aislado de nidos de otros pájaros y de excreciones de otras aves.

En la Tabla 3 se indican diversas especies de aves en las que se ha aislado el *C. neoformans*. Los resultados obtenidos en estos trabajos no son homogéneos. Muchos de ellos muestran el aislamiento de *C. neoformans* y otros criptococos, tanto de muestras de excreciones como de buche o cloaca de las aves, mientras que en otros, a veces realizados con las mismas especies, apenas si se detecta la levadura.

Staib y Schulz analizaron excrementos procedentes de 142 especies de aves consiguiendo el aislamiento de *C. neoformans* tan sólo en cuatro de todas las especies estudiadas: *Probosciger aterrimus* (cacatúa de las palmas), *Ara militaris* (guacamaya verde), *Psittacus erithacus* (loro gris africano) y *Podargus strigoides* (podargo castaño).

Mancianti *et al.* analizaron 325 muestras de heces desecadas y frescas de aves pertenecientes a la familia de las psitácidas, no obteniendo *C. neoformans* en ninguna de ellas. Esto sugiere que deben existir factores independientes de la propia composición de las heces o de la temperatura y condición del tubo digestivo de las aves, que influyen decisivamente en la presencia y persistencia de la levadura en este entorno (Mazuelos, 2010).

Tabla 3. Especies de aves en las que se han aislado especies de *Cryptococcus*

Nombre común	Especie	Especie de <i>Cryptococcus</i> encontrado
Paloma urbana	<i>Columbia livia</i>	C.n., C.a., C.l., C.t., C.u.
Tortola	<i>Zenaida auriculata</i>	C.n., C.a.
Gallina	<i>Gallus gallus</i>	C.n., C.a., C.l.
Gallina de Guinea	n.e. (familia Nurnididae)	C.n.
Patos	n.e. (familia Nurnididae)	C.n.
Gansos	<i>Chloephaga spp.</i>	C.n.
Avefría	<i>Vanellus vanellus</i>	C.n.
Urraca común	<i>Pica pica</i>	C.n.
Cernícalo vulgar	<i>Falco tinnunculus</i>	C.n.
Cernícalo primilla	<i>Falco naumanni</i>	C.a.
Halcón peregrino	<i>Falco subuteo</i>	C.l.
Bucardo (águila ratonera)	<i>Buteo buteo</i>	C.n.
Milano negro	<i>Milvus nigrans</i>	C.n.
Cerceta común	<i>Ana crecca</i>	C.a, C.l.
Focah común	<i>Fulica atra</i>	C.a., C.l.
Chocha perdiz	<i>Scolopax rusticola</i>	C.a.
Gorrión	<i>Passer domesticus</i>	C.n., C.a.
Estornino	<i>Stumus vulgaris</i>	C.n., C.a.
Alondra	<i>Alauda arvensis</i>	C.n., C.a.
Golondrina	n.e. (familia Hirundinidae)	C.n.
Cardenal común	<i>Paroaria dominicana</i>	C.n.
Canario	<i>Serinus canarius</i>	C.n., C.a.
Jilguero dorado	<i>Sicalis flaveola</i>	C.n.
Corbatita común	<i>Sporophila caerulescens</i>	C.n.
Munia (Lonchura)	<i>Passeriformes (orden)</i>	C.n.
Loro	n.e. (familia Psitacidae)	C.n., C.a., C.l.
Guacamayo verde	<i>Ara militaris</i>	C.n.
Martin pescador		C.l.
Periquito	n.e. (familia Psitacidae)	C.n. C.a.
Cacatúa	<i>Cacatua alba</i>	C.n.
Cacatúa	<i>Probosciger aterrimus</i>	C.n.
Ninfa	<i>Nymphicus hollandicus</i>	C.n.

C.n.: *Cryptococcus neoformans*; C.l.: *Cryptococcus laurentii*; C.a.: *Cryptococcus albidus*; C.t.: *Cryptococcus terreus*; C.u.: *Cryptococcus uniguttulatus*; n.e.: no especificado

(Mazuelos, 2010).

2.4.4 Factores de virulencia

Las características más estudiadas sobre *C. neoformans* son la presencia de la cápsula polisacárida y la producción de melanina. El polisacárido capsular puede inhibir la producción de ciertas linfocinas provocando respuestas tanto celular como humoral muy débiles, enlazar e inmovilizar parcialmente a los anticuerpos dirigidos contra la pared celular y la cápsula del hongo y además, enmascarar a los anticuerpos.

La presencia de la melanina funciona como un escudo que protege al hongo contra anticuerpos del hospedero, agentes oxidantes y la anfotericina B. Otros parámetros que pudiesen estar relacionados con la patogenicidad de este hongo son el tipo sexual, la biosíntesis de adenina, producción de manitol y ureasas y presencia de miristoil-transferasas (Imagen 14).

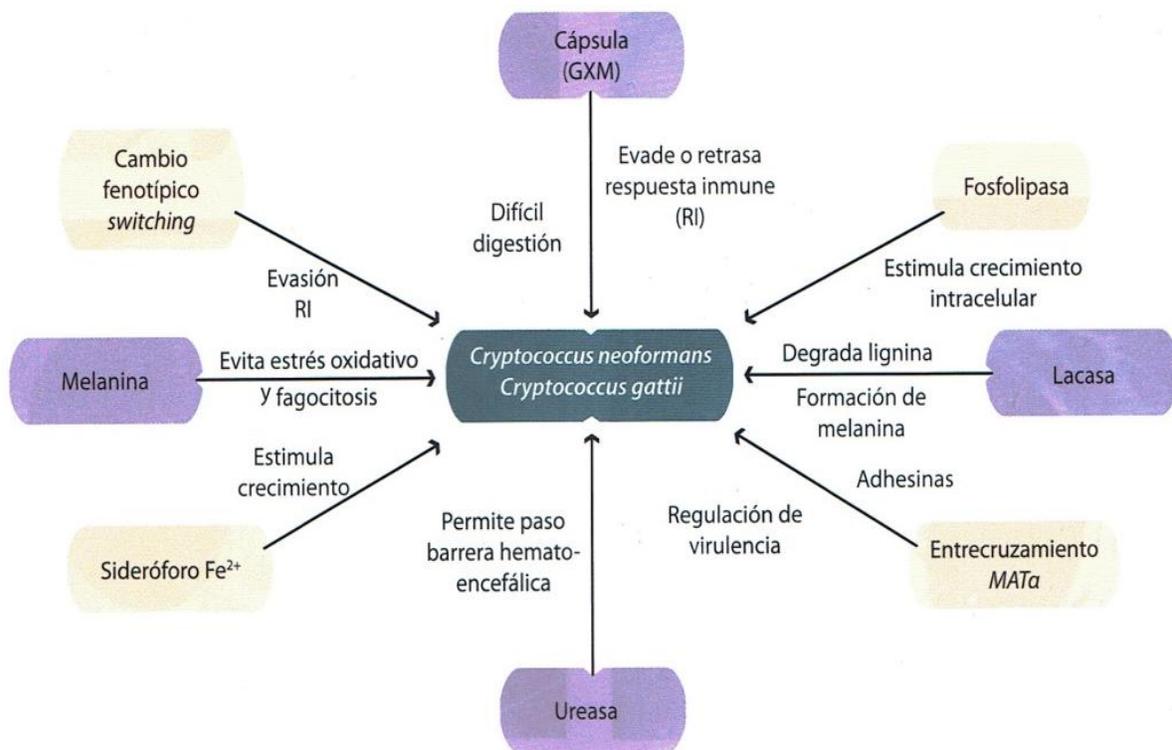


Imagen 14. Factores de virulencia para el desarrollo de *Cryptococcus sp* (Bonifaz, 2016).

2.4.5 Epidemiología

La criptococosis afecta preferentemente a criadores de palomas, aficionados a las aves y a trabajadores de laboratorio. La aparición del VIH ha incrementado considerablemente su frecuencia. En adultos el SIDA es el principal factor predisponente en más del 80 % de los casos.

Las palomas y otras aves son reservorios del hongo y fuentes de infección, ya que albergan en su organismo al *C. neoformans* sin desarrollar la enfermedad debido a que su elevada temperatura corporal es de aproximadamente 42°C. En estas condiciones el microorganismo sobrevive pero no se desarrolla. La viabilidad de las levaduras encapsuladas en las excretas de las aves se debe a factores como la humedad, la alcalinidad y presencia de productos nitrogenados, lo que les permite permanecer viables hasta más de dos años.

A pesar de que el criptococo se ha aislado de la leche y sus productos, y de algunas frutas cítricas, su ingestión no representa un problema clínico; en el caso de la leche es destruido por el proceso de pasteurización. En México, el hongo se ha aislado en el 20.7% de las muestras de excrementos de palomas colectados en áreas urbanas; en menor proporción de verduras, frutas y excremento de otras aves (Tsuji, 2005).

2.4.6 Diagnóstico

El diagnóstico clínico es difícil, ya que las formas de presentación son inespecíficas, al igual que las pruebas analíticas habituales, por lo que el diagnóstico definitivo va a ser el microbiológico o guiarse en los algoritmos de diagnóstico (Imagen 16). Esto es especialmente cierto en los casos de meningitis que se producen en los pacientes con SIDA, en los que el líquido cefalorraquídeo (LCR) no suele mostrar alteraciones o, caso de estar presentes, éstas son mínimas. Debe seleccionarse la muestra adecuada (LCR, sangre, secreciones del tracto respiratorio, piel, entre otras.), según el foco de infección.

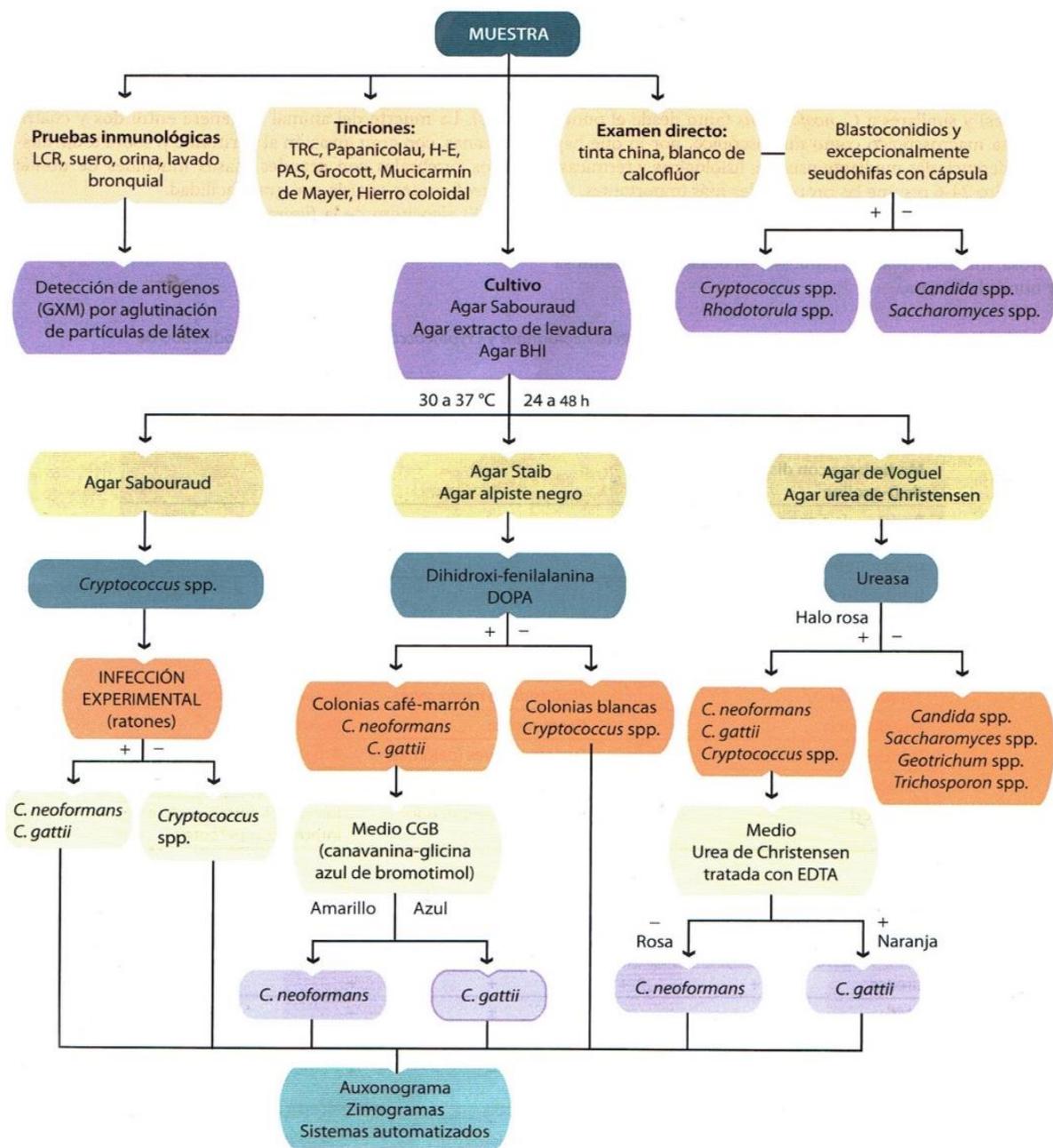
Se utiliza la tinción negativa o tinción de tinta china que tiñe toda la preparación excepto la cápsula y permite hacer un diagnóstico presuntivo de criptococosis (Imagen 15).

Se realiza a partir del sedimento del LCR, orina u otras muestras líquidas, tras centrifugación, colocando en un portaobjetos una gota de sedimento y otra de tinta china comercial; se le pone un cubreobjetos y se observa al microscopio con un objetivo seco. La preparación estará bien hecha si se puede leer a través de ella.

Pueden producirse falsos resultados positivos en presencia de levaduras de los géneros *Rhodotorula* y *Candida*, de otras especies de criptococos de bacterias como, *Klebsiella pneumoniae*, así como por artefactos. Es importante diferenciar bien la célula con doble pared refringente, con su cápsula, y hay que buscar células en fase de gemación.



Imagen 15. Tinción de tinta china para observar e identificar al *C. neoformans*.



GXM Glucoroxilomanano; TRC tinción de resaltado capsular; + positivo; - negativo; = presuntivo
 Auxonogramas comerciales: Auxacolor; Sistemas Api
 Sistemas automatizados: Rapid Yeast Panel MicroScan;
 Vitek

Imagen 16. Algoritmo diagnóstico para la identificación de especies de *Cryptococcus*

2.5 Antimicóticos

En la actualidad, la gama de medicamentos antimicóticos es muy amplia; en el mercado es posible encontrar fármacos que han pasado la prueba del tiempo y, pese a su antigüedad, continúan siendo eficaces, de fácil aplicación, resultando útiles en determinadas enfermedades, causadas por diversos tipos de hongos (Imagen 17) (Whalen, 2016).

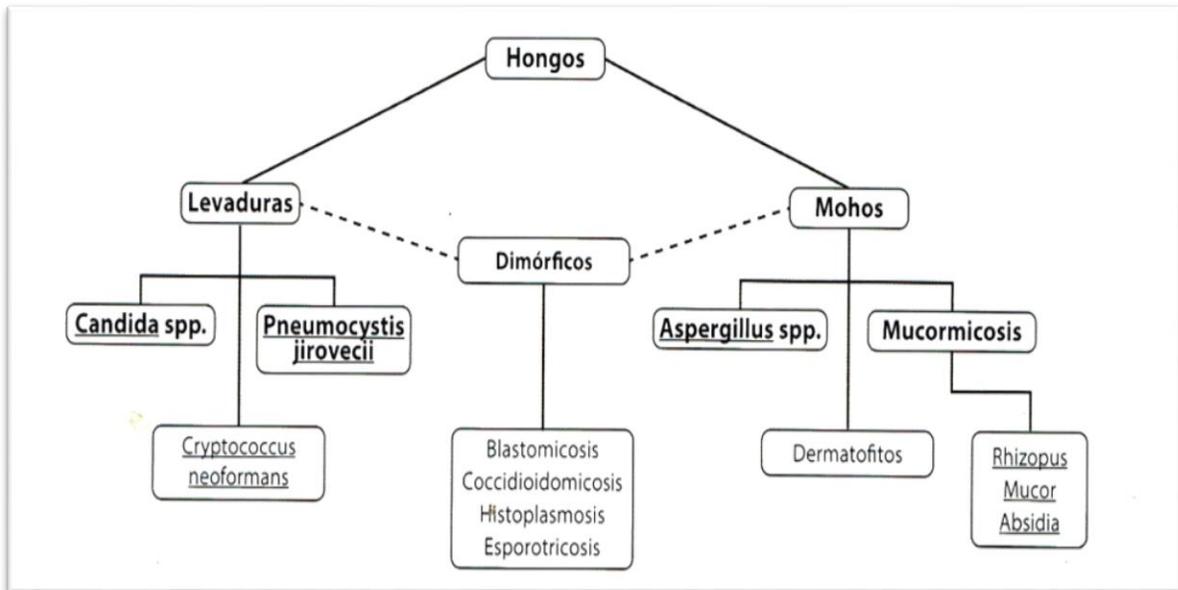


Imagen 17. Microorganismos patógenos comunes del reino de los hongos.

Los antimicóticos son una serie de medicamentos que tienen diversas acciones frente a los hongos productores de micosis superficiales, subcutáneas y profundas, tanto patógenos primarios como oportunistas.

A este tipo de fármacos se les puede dividir de acuerdo a sus diferentes características: mecanismo de acción (Imagen 18), composición química, espectro de acción, tipo de acción, tipo de micosis contra la que actúan, entre otras, como se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 4. Tipos de antimicóticos y grupos de químicos a los que pertenecen.

Tipo de Antimicótico	Grupos y ejemplos
1. Inhibidores de la síntesis del ergosterol (membrana fúngica)	- Imidazólicos: bifonazol, ketoconazol, miconazol, isoconazol, luliconazol, entre otras. - Triazólicos: fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol, entre otras. - Alilaminas: naftifina, terbinafina. - Bencilaminas: butenafina.
2. Desestabilizadores de membrana fúngica (derivados poliénicos)	- Anfotericina B - Nistatina - Pimaricina (natamicina)
3. Inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos	- 5-fluorocitosina
4. Inhibidores de la mitosis fúngica	- Griseofulvina
5. Inhibidores de la síntesis de proteínas	- Sordarinas - Oxaboroles
6. Inhibidores de la síntesis de pared celular fúngica	-Equinocandinas y neumocandinas: micafungina, anidulafungina y caspofungina
7. Grupo misceláneo	- Amorolfina - Ciclopiroxolamina - Derivados tiocarbamatos: tolnaftato y tolclolato

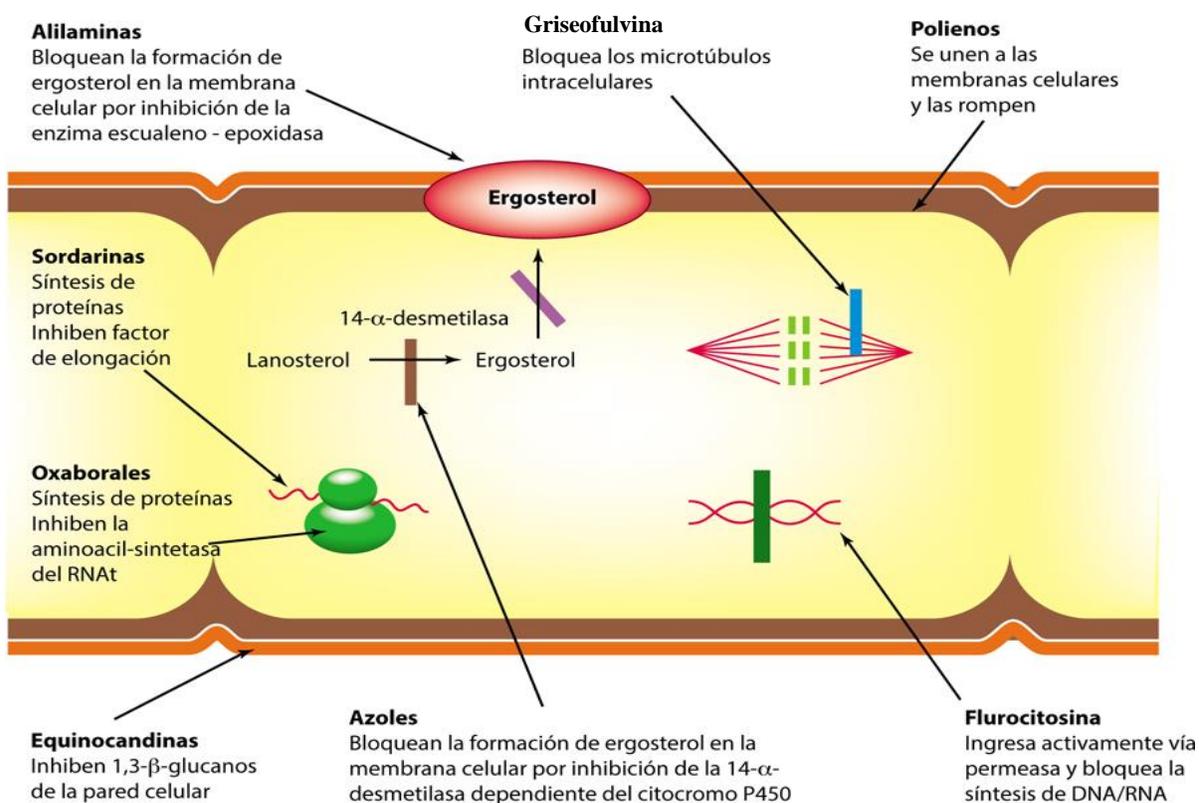


Imagen 18. Mecanismo de acción de los antimicóticos (Bonifaz, 2016).

2.5.1 Anfotericina B

La Anfotericina B es un antimicótico macrólido poliénico natural producido por *Streptomyces nodosus*. A pesar de su potencial tóxico, la anfotericina B es el medicamento de elección para el tratamiento de las micosis sistémicas que ponen en riesgo la vida.

1. *Mecanismo de acción*: se une al ergosterol en las membranas plasmáticas de las células micóticas sensibles. Ahí forma poros (canales) que requieren interacciones hidrofobas entre el segmento lipófilo del antimicótico poliénico y el esterol. Los poros alteran la función de la membrana y permiten que los electrolitos (sobre todo el potasio) y las moléculas pequeñas abandonen la célula, la cual muere (Imagen 19) (Bonifaz, 2016).

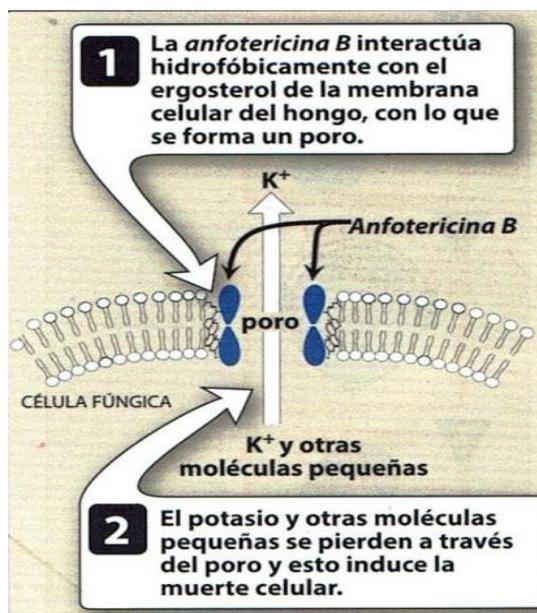


Imagen 19. Modelo de un poro formado por la Anfotericina B en la bicapa lipídica de la membrana.

2. *Espectro antimicótico*: es fungicida o fungistática, lo que depende del microorganismo y la concentración del medicamento. Es eficaz contra una amplia gama de hongos, incluidos *Candida albicans*, *Histoplasma capsulatum*, *Cryptococcus neoformans*, *Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis* y muchas cepas de *Aspergillus*.

3. *Resistencia*: la resistencia de los hongos, aunque infrecuente, se relaciona con disminución del contenido de ergosterol de su membrana.

4. *Farmacocinética*: se administra en infusión IV lenta. Es insoluble en agua y debe formularse con desoxicolato sódico o con una variedad de lípidos artificiales para formar liposomas. Se une en gran medida a las proteínas plasmáticas y se distribuye por todo el organismo. La inflamación favorece que pueda penetrar en diversos líquidos corporales,

aunque apenas llega al líquido cefalorraquídeo (LCR), el humor vítreo o el líquido amniótico; no obstante, puede cruzar la placenta.

5. *Efectos adversos*: tiene un índice terapéutico bajo. Las manifestaciones tóxicas son:

a. Fiebre y escalofríos: suelen presentarse de una a tres horas después de la administración IV. La premedicación con un corticoesteroide o un antipirético ayuda a prevenir este problema.

b. Insuficiencia renal: a pesar de las bajas concentraciones del medicamento que se excretan en la orina, los pacientes pueden mostrar un descenso de la tasa de filtración glomerular y la función tubular renal.

c. Hipotensión.

d. Tromboflebitis: este problema puede mitigarse si se añade heparina a la infusión.

2.5.2 Flucitosina

La flucitosina (5-FC) es un antimetabolito pirimidínico sintético que a menudo se usa en combinación con la anfotericina B. Esta combinación de medicamentos se administra para tratar las micosis sistémicas y las meningitis causadas por *Cryptococcus neoformans* y *Candida albicans*.

1. *Mecanismo de acción*: penetra las células fúngicas mediante una permeasa específica de citosina, una enzima que no se halla en las células de los mamíferos. A continuación se convierte en una serie de compuestos que incluyen 5-fluorouracilo y 5-fluorodesoxiuridina 5'-monofosfato, que alteran la síntesis de ácido nucleico y proteína. La anfotericina B aumenta la permeabilidad de la célula, lo que permite que más 5-FC entre a su interior y que se produzcan efectos sinérgicos (Imagen 20) (Bonifaz, 2016).

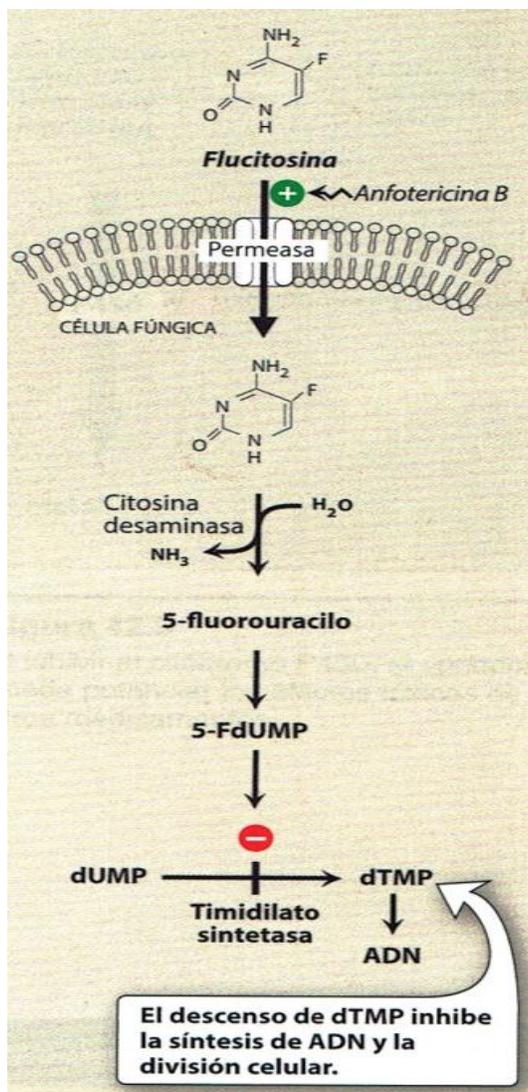


Imagen 20. Modo de acción de la flucitosina

2. *Espectro antimicótico*: la 5-FC es fungistática. Es eficaz en combinación con itraconazol para el tratamiento de la cromoblastomycosis y combinada con anfotericina B para tratar la candidiasis y la criptococosis.

3. *Resistencia*: durante el tratamiento puede desarrollarse resistencia por disminución de las concentraciones de cualquiera de las enzimas que intervienen en la conversión de la 5-FC en 5-fluorouracilo (5-FU).

4. *Farmacocinética*: se absorbe bien por vía oral, se distribuye a través del agua corporal y penetra bien en el LCR. El medicamento y sus metabolitos se excretan por filtración glomerular.

5. *Efectos adversos*: causa neutropenia reversible, trombocitopenia y depresión medular dependiente de la dosis, los trastornos digestivos (nauseas, vómito y diarrea) son frecuentes y también puede observarse enterocolitis grave (Bonifaz, 2016).

2.5.3 Antimicóticos azólicos

Los antimicóticos azólicos están constituidos por dos tipos de medicamentos diferentes: imidazoles y triazoles. Aunque estos agentes tienen mecanismos de acción y espectros de actividad similares, su farmacocinética y usos terapéuticos varían de modo significativo. En general, los imidazoles se aplican por vía tópica para infecciones cutáneas, en tanto que los triazoles se administran de forma sistémica para el tratamiento y la profilaxis de infecciones micóticas.

1. *Mecanismo de acción*: los azoles son predominantemente fungistáticos. Inhiben la actividad de la C-14 α desmetilasa (una enzima del citocromo P450), con lo que bloquean la desmetilación de lanosterol a ergosterol, el principal esteroles de las membranas fúngicas. La inhibición del ergosterol altera la estructura y la función de la membrana, lo que, a su vez, impide el crecimiento de la célula fúngica (Imagen 21) (Whalen, 2016).

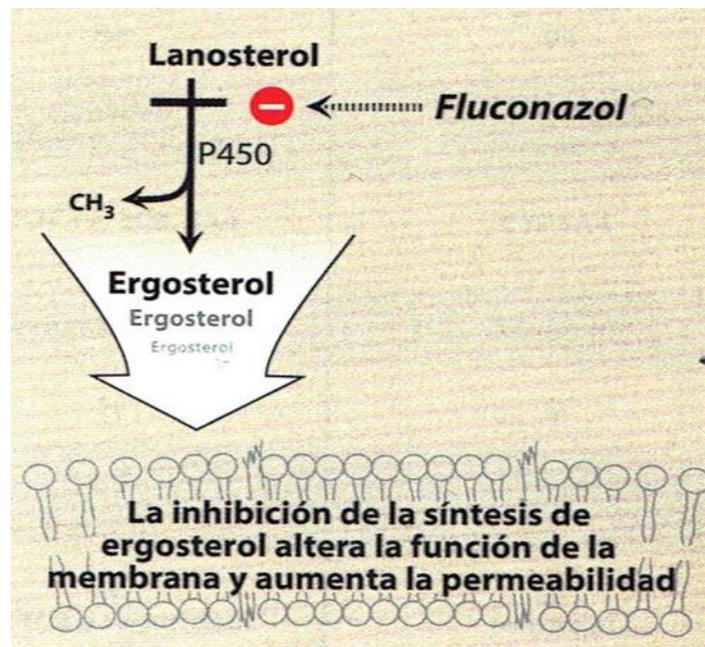


Imagen 21. Mecanismo de acción de los azoles

2. *Resistencia*: la resistencia a los antimicóticos azoles está convirtiéndose en un problema clínico importante, en particular con el tratamiento prolongado que requieren los pacientes inmunocomprometidos; los mecanismos de resistencia incluyen mutaciones en el gen C-14 α desmetilasa.

3. *Interacciones medicamentosas*: todos los azoles inhiben la isoenzima CYP450 3A4 en distintas medidas. Los pacientes que toman al mismo tiempo medicamentos que son sustratos para esta isoenzima pueden presentar menores concentraciones.

4. *Contraindicaciones*: se consideran teratógenos, y se deben evitar en el embarazo a menos que el posible beneficio sobrepase el riesgo implicado para el feto.

2.5.4 Fluconazol

El fluconazol fue el primer miembro de los tiazoles entre los antimicóticos. Es el menos activo de todos los tiazoles, y la mayor parte de su espectro se limita a las levaduras y algunos hongos dimórficos. Es muy activo contra el *Cryptococcus neoformans* y ciertas especies de *Candida*.

El fluconazol se indica para la profilaxis contra infecciones micóticas invasivas en receptores de trasplante de médula ósea, para *Cryptococcus neoformans* después de la terapia de inducción con Anfotericina B y flucitosina y se incluye en el tratamiento de la candidemia y de la coccidioidomicosis.

Se absorbe bien después de la administración oral y se distribuye ampliamente en todos los líquidos y tejidos corporales. La mayor parte del medicamento se elimina sin cambios por la orina; las dosis se deben reducir en pacientes con disfunción renal. Los efectos adversos más comunes con fluconazol son náuseas, vómito, cefalea y exantemas cutáneos; también se puede presentar hepatotoxicidad (Whalen, 2016).

3. JUSTIFICACIÓN

En las últimas décadas se ha reportado un incremento considerable en la incidencia de micosis y los principales agentes causales son *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Aspergillus spp*, *Cryptococcus neoformans* y *Candida spp*.

Para el tratamiento de estas micosis se utilizan antimicóticos azólicos, triazólicos, bencilaminas, Anfotericina, entre otros, que han reportado alta toxicidad en la población.

Es por ello que se propone al propóleo como alternativa de tratamiento para las micosis y se demostrará su actividad fungicida sobre *Cryptococcus neoformans* para tener las bases de dicha actividad biológica.

4. OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar la actividad antimicótica de extractos de propóleos mexicanos sobre *Cryptococcus neoformans* mediante pruebas de susceptibilidad para establecer una opción de tratamiento alternativo para las micosis.

Objetivos particulares

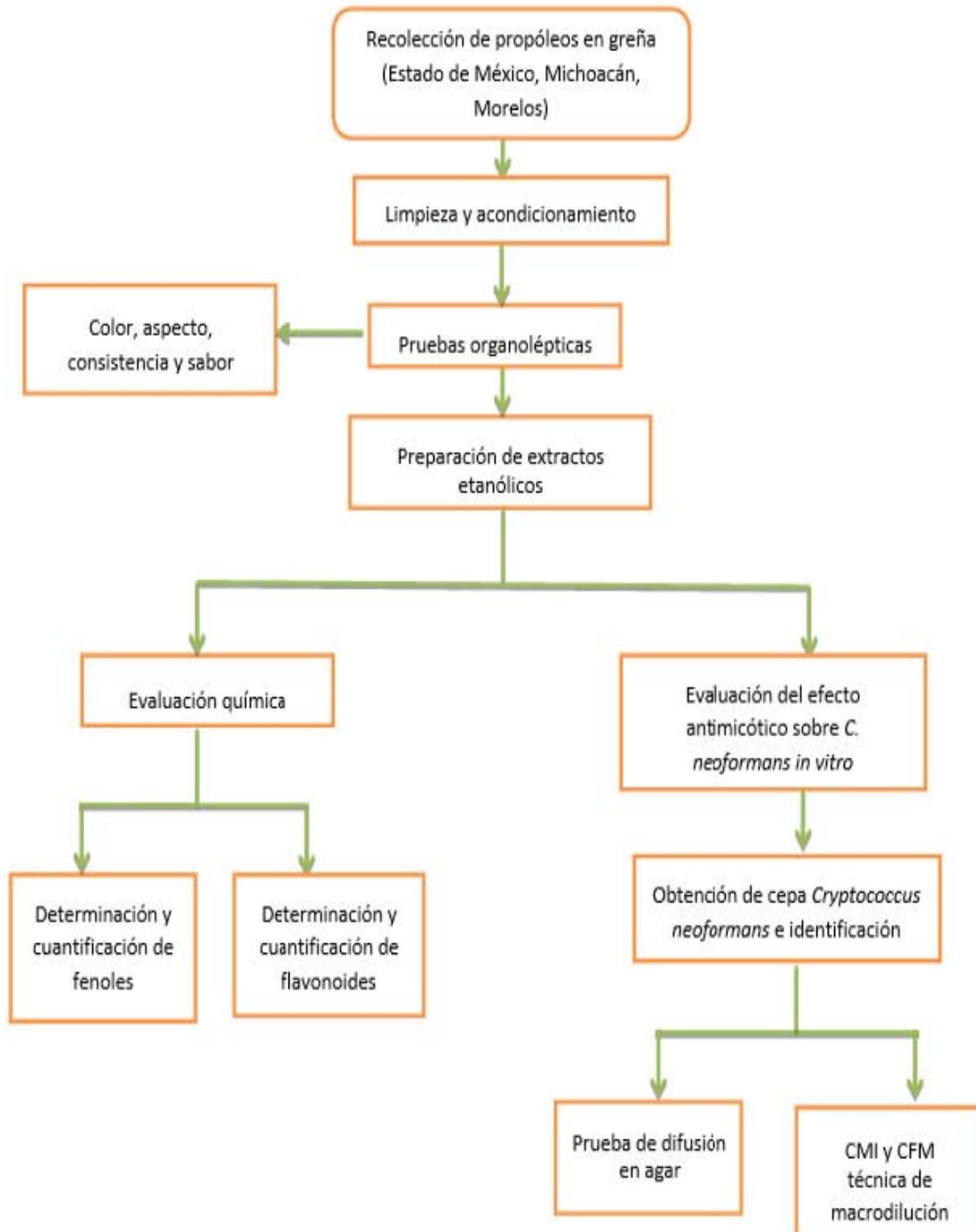
1. Recolección de propóleos de diversos apiarios mexicanos.
2. Obtención de los extractos blandos de propóleos.
3. Determinación de la concentración de fenoles y flavonoides.
4. Evaluación de la actividad antimicótica por el método de prueba de difusión en agar.
5. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Fungicida Mínima (CFM) de los extractos etanólicos de propóleos (EEP) sobre *Cryptococcus neoformans* mediante la técnica de macrodilución.

5. HIPÓTESIS

La concentración de fenoles y flavonoides en los propóleos está relacionada de manera directa con su actividad antimicótica, entonces si presenta mayor concentración de estos compuestos, los propóleos evaluados podrán ejercer un mejor efecto fungicida sobre *Cryptococcus neoformans*.

6. METODOLOGÍA

6.1 Diagrama experimental



6.2 Recolección de propóleos mexicanos

Se emplearon tres muestras de propóleo en greña provenientes de apiarios ubicados en diferentes regiones de México: Tlalpujahua, Michoacán; Tepoztlán, Morelos y El Oro, Estado de México

Una vez recolectados se procedió a realizar la limpieza manualmente de cada uno, para eliminar impurezas como trozos de madera, restos de abejas u otros insectos, piedras y ceras propias de la colmena. Posteriormente se conservaron en refrigeración ya que los propóleos a bajas temperaturas se vuelven rígidos favoreciendo la maceración y protegidos de la luz mediante frascos color ámbar para evitar su descomposición; los cuales se abrieron hasta su utilización.

6.3 Obtención del Extracto Etanólico de Propóleo (EEP)

La constitución química básica es una mezcla de resinas y bálsamos, cera de abeja, aceites esenciales y algunos minerales. El disolvente de elección para la extracción de componentes biológicamente activos del propóleo (compuestos fenólicos) es el alcohol etílico al 70%.

Posteriormente, es necesario filtrar varias veces con el fin de asegurar la completa recuperación de los compuestos fenólicos. Después de la disolución de la porción insoluble se separa por filtración y el solvente se evapora a sequedad a presión reducida para obtener el extracto blando de propóleos que será utilizada en el análisis.

Para la metodología completa de la extracción etanólica de los propóleos ver Anexo 1.

6.4 Pruebas cualitativas

Se realizaron las pruebas de cloruro férrico (FeCl_3) al 1% para la detección de fenoles y la de hidróxido de sodio (NaOH) al 20% para la detección de flavonoides.

6.4.1 Detección de Fenoles

De acuerdo a Vilchis 2016, la detección de fenoles en los EEP indica que la mayor parte de los fenoles dan disoluciones coloreadas (azul, verde, violeta, negro, entre otros). Si el color es amarillo débil (mismo que el reactivo), la reacción se considera negativa.

Algunos fenoles no dan coloración, como la hidroquinona, ya que se oxidan con el reactivo a quinona. Los ácidos, a excepción de los fenólicos, no dan la reacción, aunque algunos dan disoluciones o precipitados de color amarillento (Anexo 2).

6.4.2 Detección de Flavonoides

Este análisis químico fue realizado usando la metodología propuesta por la Norma Ramal Cubana Apicultura NRAG 1129.1994, basado en la formación de compuestos coloreados por la reacción de los flavonoides con acetato de plomo ($\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2$), que deben colorearse rápidamente de un color anaranjado-amarillento (Rodríguez, 2015).

Para el aislamiento de flavonoides se recurre a la extracción con solventes de polaridad creciente o directamente con álcali.

En contacto con hidróxido de sodio (NaOH) se presenta un color amarillo intenso característico de flavonas y flavonoles cuando se requiere conocer la presencia de estos compuestos (Anexo 3).

6.5 Pruebas cuantitativas

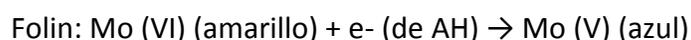
Se construyó una curva de calibración de fenoles y flavonoides utilizando una disolución estándar de ácido gálico y quercetina, respectivamente.

La relación entre las concentraciones y las absorbancias de las soluciones estándar permitió determinar el contenido de fenoles y flavonoides en las muestras preparadas a una concentración de 0.05 mg/mL, utilizando la ecuación de regresión correspondiente a cada prueba (Rodríguez, 2015).

6.5.1 Fenoles

La concentración de fenoles totales (CFT) se midió por espectrofotometría de absorción UV-VIS con base en una reacción colorimétrica de óxido-reducción, para ello el agente oxidante que se utiliza es el reactivo de Folin-Ciocalteu (FC), $3\text{H}_2\text{O}-\text{P}_2\text{O}_5\text{I}_3\text{WO}_3-5\text{MoO}_3-10\text{H}_2\text{O}$ (mezcla de ácido fosfotúngstico/fosfomolibdico hexavalente).

El reactivo contiene molibdato y tungstato sódico, que reaccionan con cualquier tipo de fenol, formando complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico. La transferencia de electrones a pH básico reduce los complejos fosfomolibdico-fosfotúngstico en óxidos, cromógenos de color azul intenso, de tungsteno (W_8O_{23}) y molibdeno (Mo_8O_{23}), siendo proporcional este color al número de grupos hidroxilo de la molécula.



Para ver la metodología completa ver Anexo 4.

6.5.2 Flavonoides

El principio básico del método colorimétrico de cloruro aluminio ($AlCl_3$), es que éste forma complejos estables de ácidos con el grupo cetona en C-4 o bien el grupo hidroxilo en C-3 o C-5 de flavonas y flavonoles. Además, también forma complejos lábiles ácidos con los grupos hidroxilo en el anillo A o B de los flavonoides.

Para ver la metodología completa ver Anexo 5.

6.6 Prueba de difusión en agar

Esta es una prueba cualitativa que únicamente reflejará si la muestra a evaluar inhibe el crecimiento fúngico por medio de sensidiscos impregnados con el extracto etanólico de propóleo que difundirá sobre la placa de agar (Anexo 6).

6.7 Prueba de CMI y CMF

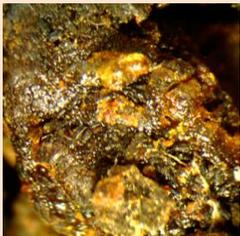
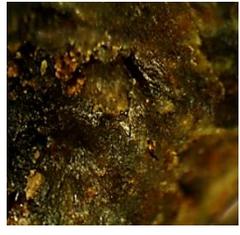
La concentración a la cual existe una disminución drástica del crecimiento representa la *Concentración Mínima Inhibitoria* (CMI). La concentración que produce una inhibición completa del desarrollo del hongo representa la *Concentración Mínima Fungicida* (CMF); en todos los casos, esta prueba se realizó por triplicado, utilizando la cepa de *Cryptococcus neoformans* proporcionada por el Laboratorio 6 de Microbiología de la UIM, FES Cuautitlán, Campo 4 (Anexo 7).

7. RESULTADOS

7.1 Colecta y origen de los propóleos.

En la Tabla 5 se muestran los resultados de la apariencia de los propóleos recolectados, tanto en greña como el EEP, provenientes del Estado de México, Morelos y Michoacán.

Tabla 5. Apariencia de los propóleos en greña, así como de su extracto.

Muestra	Propóleo en greña	Extracto
Michoacán		
Morelos		
Estado de México		

7.2 Especificaciones organolépticas.

Los tres propóleos analizados mostraron una tendencia de color marrón verdoso, aromático, de sabor amargo y maleable; también a simple vista se pudo apreciar cierto brillo en las muestras, como se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6. Resultados de las propiedades organolépticas de los propóleos en greña

Propóleo	Parámetros				
	Color	Aroma	Sabor	Aspecto	Consistencia
Michoacán	Marrón claro- Marrón verdoso, tintes amarillos	Aromático	Amargo	Trozos irregulares con brillo	Maleable
Morelos	Marrón verdoso, tintes amarillos	Aromático	Amargo	Trozos irregulares con brillo	Maleable
Estado de México	Marrón verdoso, tintes amarillos	Aromático	Amargo	Trozos irregulares con brillo	Muy maleable

7.3 Especificaciones químicas.

Se realizó la determinación cualitativa para verificar la presencia de fenoles y flavonoides en las muestras.

7.3.1 Determinación cualitativa de fenoles

Como no es una prueba selectiva, sino una prueba confirmatoria para la presencia de fenoles, la coloración se aprecia entre un color verde oscuro a negro; esto a la presencia de distintos fenoles presentes en los EEP.

Tabla 7. Resultados de prueba cualitativa de fenoles

Extracto	Resultado
Michoacán	Positivo
Morelos	Positivo
Edo. México	Positivo

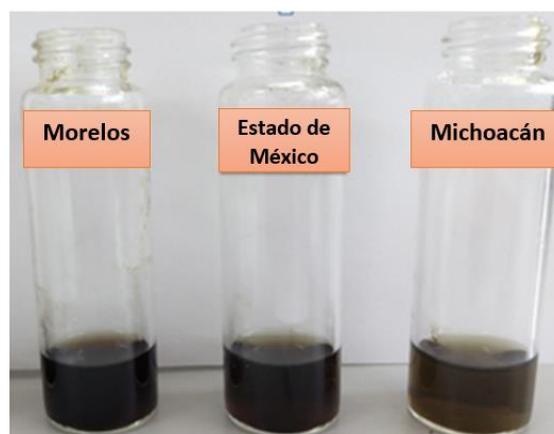


Imagen 22. Determinación cualitativa de fenoles.

7.3.2 Determinación cualitativa de flavonoides

Al igual que con la prueba de fenoles, esta no es una prueba selectiva, sino una prueba cualitativa para la presencia de flavonoides, la coloración más intensa es reflejo de una mayor cantidad de flavonoides.

Tabla 8. Resultados de prueba cualitativa de flavonoides

Extracto	Resultado
Michoacán	Positivo
Morelos	Positivo
Estado de México	Positivo



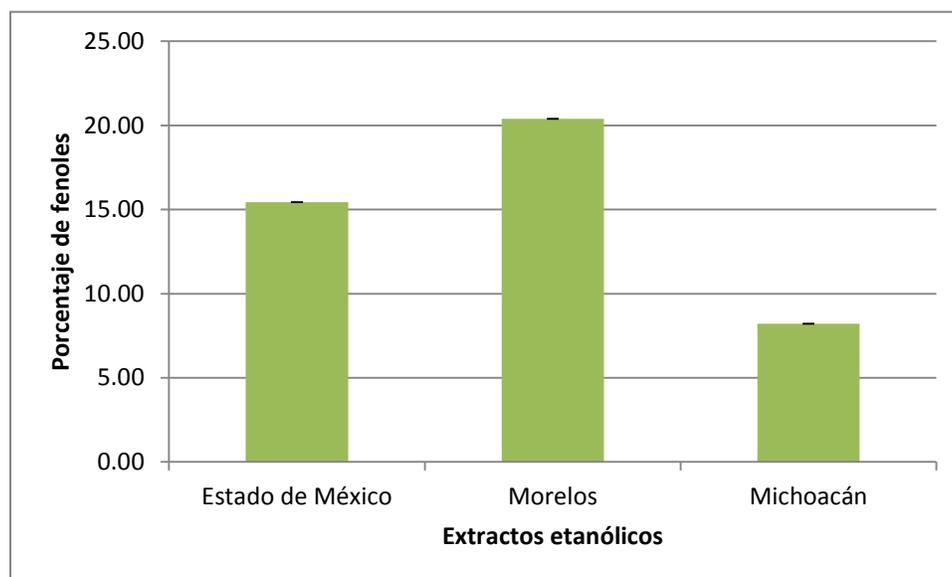
Imagen 23. Determinación cualitativa de flavonoides.

7.3.3 Determinación cuantitativa de fenoles

En la Tabla 9 se muestran los contenidos de fenoles de los tres EEP; así como su porcentaje de fenoles totales en cada uno de los extractos.

Tabla 9. Resultados de la cuantificación de fenoles totales en los extractos evaluados.

Propóleo	Contenido de fenoles en extracto etanólico (mg ácido gálico/g EEP)	Equivalentes AG/g EEP	Desviación estándar	%
Estado de México	0.0077	154.34	0.0003	15.43
Morelos	0.0102	204.04	0.0001	20.4
Michoacán	0.0041	82.07	0.0003	8.21



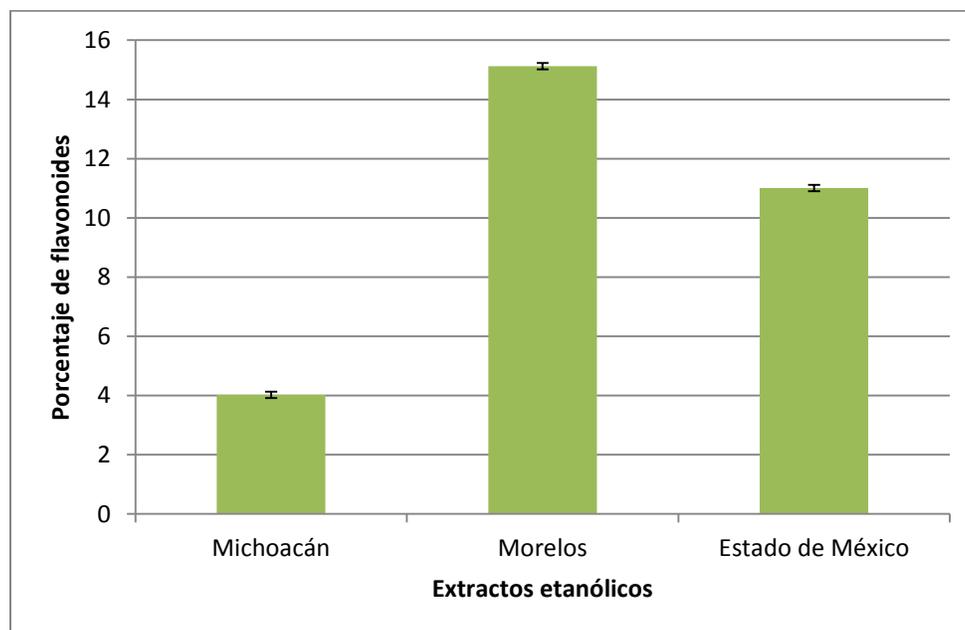
Gráfica 1. Determinación cuantitativa de fenoles totales

7.3.4 Determinación cuantitativa de flavonoides

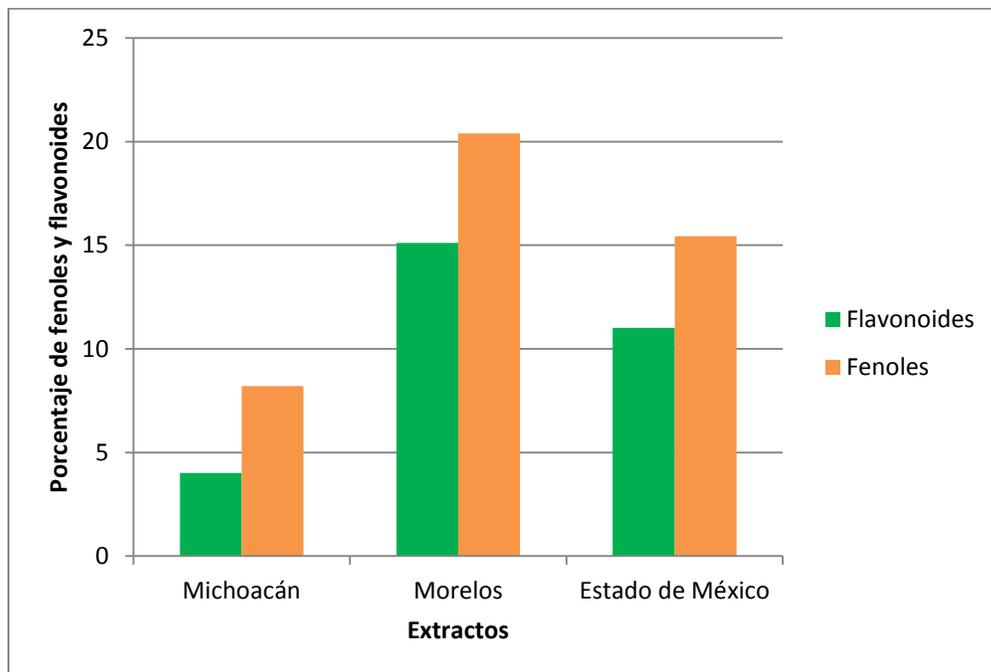
En la Tabla 10 se muestran los contenidos de flavonoides de los tres EEP, así como el porcentaje de flavonoides totales en cada extracto.

Tabla 10. Resultados de la cuantificación de flavonoides totales en los extractos evaluados.

Propóleo	Contenido de flavonoides en extracto etanólico (μg quercetina /g EEP)	Equivalentes quercetina/g EEP	Desviación estándar	%
Michoacán	2.01	0.0020	0.109	4.02
Morelos	7.56	0.0076	0.109	15.12
Estado de México	5.51	0.0055	0.106	11.01



Gráfica 2. Cuantificación de Flavonoides



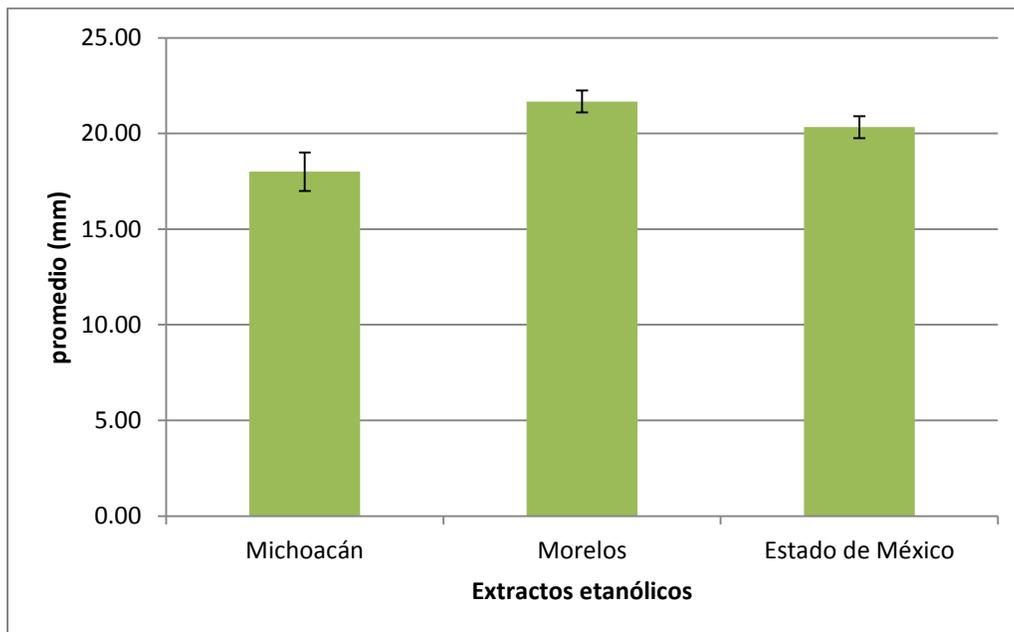
Gráfica 3. Comparación de contenido de fenoles y flavonoides en los tres extractos

7.4 Prueba de difusión en agar

En la Tabla 11 se muestran los promedios en el tamaño de los halos de inhibición, de cada EEP con una cantidad de 5 mg/disco (Imagen 24).

Tabla 11. Resultados de la prueba de inhibición del crecimiento por el método de difusión en placa.

Extracto	Concentración del EEP (5 mg/disco)				
	Repetición 1 (mm)	Repetición 2 (mm)	Repetición 3 (mm)	Promedio (mm)	Desviación estándar
Michoacán	19	18	17	18	1.00
Morelos	21	22	22	22	0.58
Edo. Méx.	20	20	21	20	0.58



Gráfica 4. Promedio en mm de los halos de inhibición de los EEP frente a *C. neoformans*

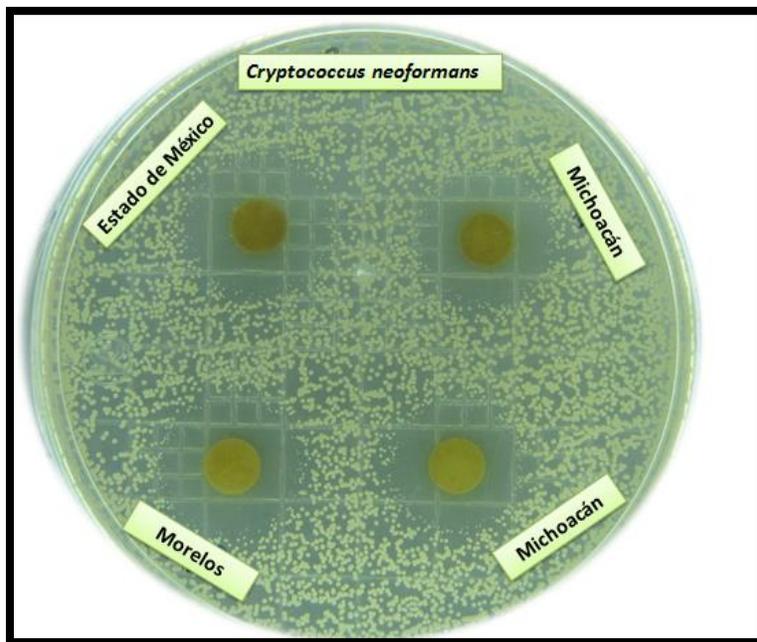


Imagen 24. Prueba de difusión en agar de los tres EEP (Morelos, Estado de México y Michoacán) con la cepa de *Cryptococcus neoformans* a una concentración de 5 mg/disco.

7.5 Prueba de macrodilución para determinar la CMI y CFM.

Para encontrar la concentración real de cada EEP, a la cual se ejerce un efecto fungicida se desarrolló la prueba de CMI y CFM, los resultados se muestran en la tabla 12 y la gráfica 5.

Tabla 12. Concentraciones a evaluar en la prueba de CMI y CFM.

Tubo	Concentración
1	2.5 mg/mL
2	1.25 mg/mL
3	0.625 mg/mL
4	0.3125 mg/mL
5	0.1562 mg/mL
6	0.0781 mg/mL
7	0.0390 mg/mL
8	0.0195 mg/mL
9	0.0097 mg/mL
10	0.0048 mg/mL

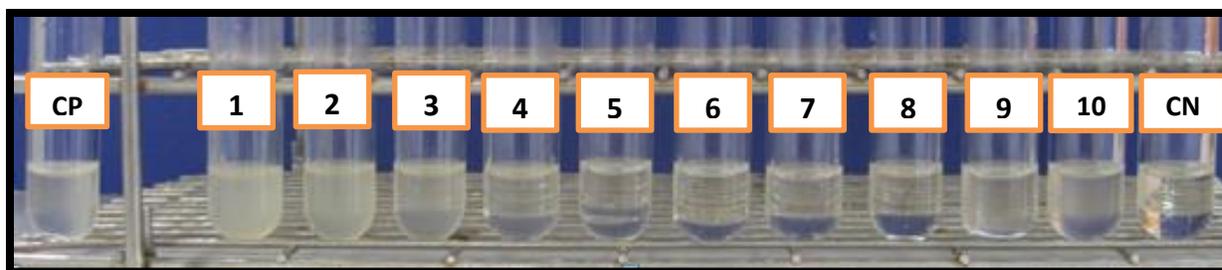


Imagen 25. Diluciones para la prueba de CMI y CFM en un rango de 2.5 mg/mL a 0.0048 mg/mL.

CP: caldo con inóculo del hongo; CN: caldo SDA sin inóculo.

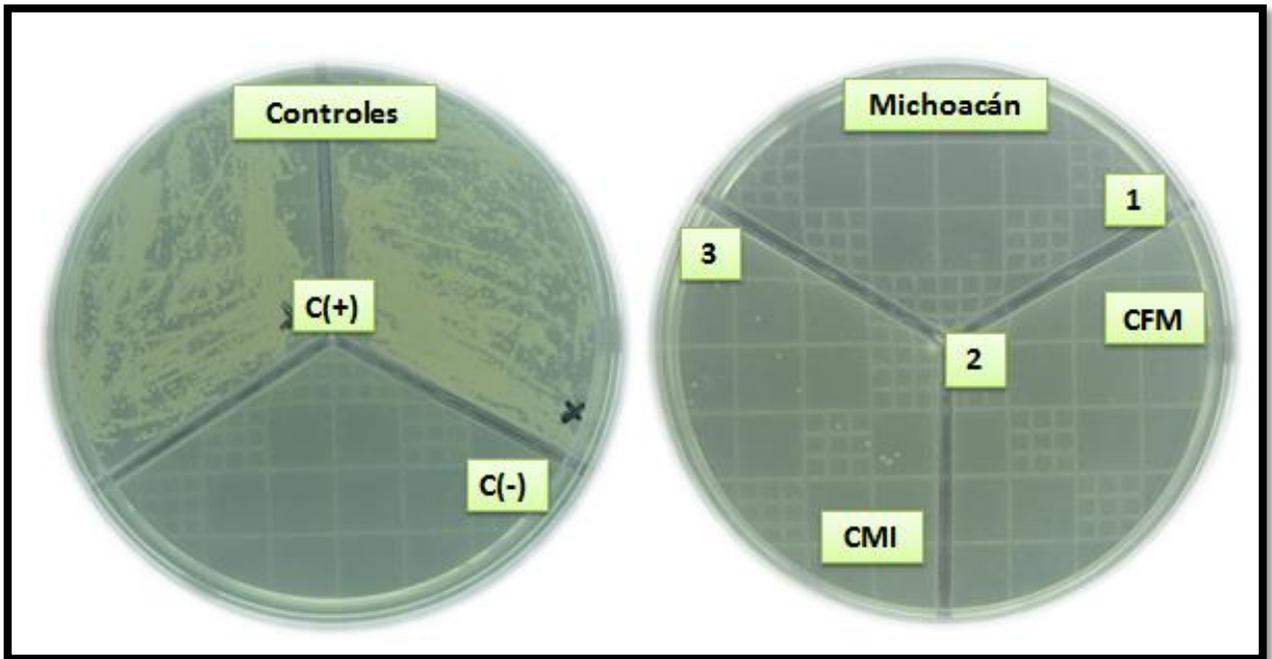


Imagen 26. Controles positivos y negativo de la prueba de CMI y CFM (izquierda), Resultados de la prueba de CMI y CFM para el extracto etanólico de propóleo de Michoacán.

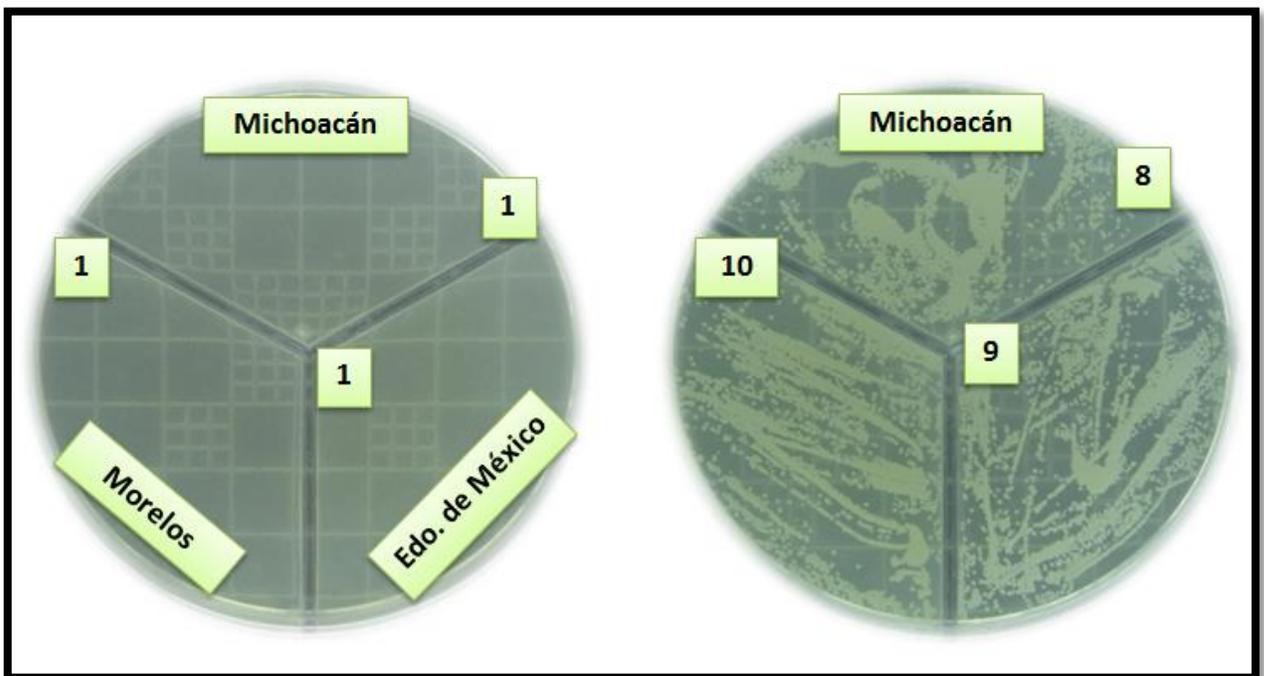
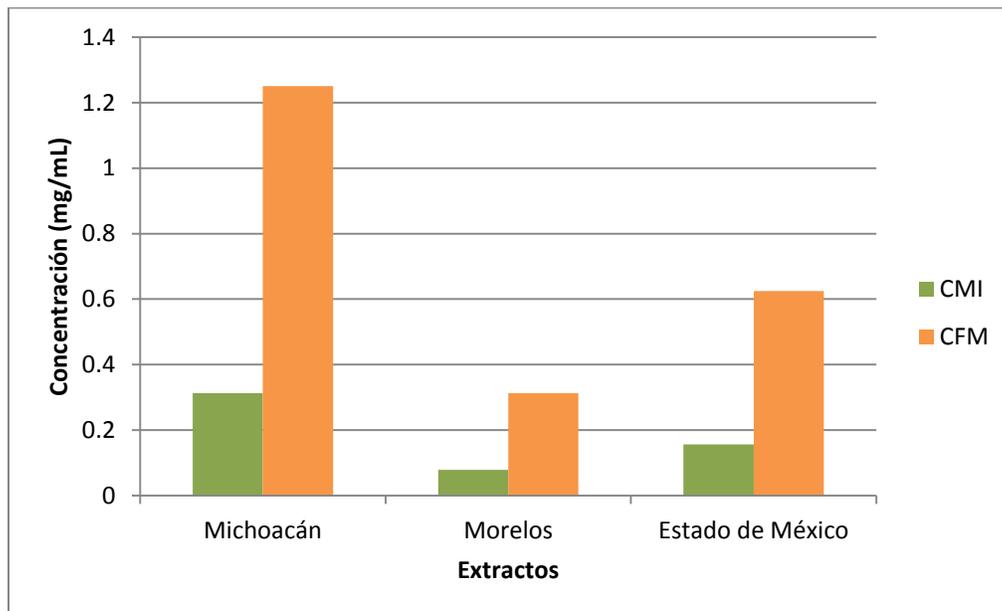


Imagen 27. Resultados del efecto con una concentración de 2.5 mg/mL (izquierda) y efecto con una concentración de 0.0048 (10), 0.0097 (9) y 0.0195 (8) mg/mL (derecha) para el EEP de Michoacán

Tabla 13. Resultados de la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y la Concentración Fungicida Mínima (CFM)

Extracto	CMI mg/mL	CFM mg/mL
Michoacán	0.3125	1.25
Morelos	0.0781	0.3125
Estado de México	0.1562	0.625



Gráfica 5. Resultado de la CMI y la CFM

8. ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto antimicótico de tres propóleos (Estado de México, Morelos y Michoacán) sobre la levadura *Cryptococcus neoformans*; a su vez demostrar que tanto los fenoles y flavonoides presentes en los diferentes propóleos están íntimamente ligados al efecto antimicótico.

Lo primero que se hizo fue la evaluación de las características organolépticas, principalmente del color, aroma y sabor. Estas características están mediadas primordialmente por el clima (localización geográfica, temperatura y humedad) y por la vegetación que rodea a las colmenas (Lozina, 2010).

En la región de Morelos se cuenta con una gran variedad de vegetación, principalmente constituida por bosques y pastizales. Se caracteriza por presentar pirul (*Schinus molle*), aile (*Alnus acuminata Kunt*), jacaranda (*Jacaranda mimosifolia*), álamo blanco (*Populus alba L.*), fresno (*Fraxinus excelsior L.*), colorín (*Erythrina americana*), trueno (*Ligustrum vulgare*) en sus diferentes variedades: teja blanca (*Tilia platyphyllos Scop.*), cedro (*Cedrela odorata L.*), eucalipto (*Eucalyptus globulus*) y fresno (*Fraxinus excelsior L.*), entre otros (INAFED, 2015).

Las especies de la región del Estado de México son pino (*Pinus sp.*), ocote (*Pinus teocote Schltdl.*), encino (*Quercus rugosa*), oyamel (*Abies religiosa*), cedro (*Cedrela odorata L.*), fresno (*Fraxinus excelsior L.*), eucalipto (*Eucalyptus globulus*), tepozán (*Buddleia cordata Kunth*), sauce llorón (*Salix babylonica L.*), roble (*Quercus robur L.*), trueno (*Ligustrum vulgare*) y casuarinas (*Casuarina equisetifolia L.*). Árboles frutales: manzana (*Malus Communis L.*), pera (*Pyrus Communis L.*), ciruelo (*Prunus domestica*), durazno (*Prunus persica*), membrillo (*Cydonia oblonga*), perón (*Capsicum pubescens*), tejocote (*Crataegus Pubescens*) y capulín (*Prunus salicifolia*). Cactáceas: cactus (*Cereus coryne*), pitaya (*Hylocereus undatus*), nopalillo (*Nopalxochia*). Hierbas medicinales: altamisa (*Artemisa vulgaris*), árnica (*Arnica montana L.*), borraja (*Borago officinalis L.*), cedrón (*Aloysia triphylla*), estafiate (*Artemisia ludoviciana*), romero (*Rosmarinus officinalis*), ruda (*Ruta graveolens*), tabaquillo (*Solanum mauritianum*), peshtó (*Eupatorium deltoideum*), epazote de perro (*Chenopodium ambrosioides*), pericón (*Hypericum tomentosum L.*), hierba del cáncer (*Cuphea aequipetala Cav.*), toronjil (*Melissa officinalis*), manzanilla (*Chamaemelum nobile*), té de monte (*Satureja macrostema*), ajenjo (*Artemisia absinthium L.*), marrubio (*Marrubium vulgare L.*), prodigiosa (*Kalanchoe pinnata*), yerbabuena (*Mentha sativa*) y doradilla (*Ceterach officinarum*) (INAFED, 2015).

La vegetación predominante en el área de Michoacán son los pinares, conformados por *Pinus pseudostrabus*, se incluyen también *P. montezumae*, *P. leiophylla*, *P. patula* y *P. teocote*; especies herbáceas como *Alchemilla*, *Bracharis*, *Arenaria*, *Bidens*, *Eupatorium*, *Festuca*, *Muhlenbergia*, *Senecio*, *Sporobolus*, *Stevia*. Los agrosistemas incluyen

reforestaciones de *Pinus* y *Cupresus*, huertas de caducifolios; para primavera-verano el sistema dominante es maíz para grano con punta de riego, también existe maíz de temporal, avena y trigo, para otoño-invierno básicamente se cultiva avena forrajera y en menor proporción trigo para grano. La actividad apícola incluye cosecha a finales de mayo y noviembre (INAFED, 2015).

Se observa la variabilidad de vegetación que rodea a los apiarios de donde se recolectaron las muestras, por lo cual no puede establecerse parámetros para las características físicas de los propóleos.

Posteriormente se obtuvo el extracto etanólico de cada propóleo por el método de maceración, utilizando etanol al 70% por ser aceptado como el disolvente de elección para la extracción de componentes biológicamente activos del propóleo (principalmente fenólicos, incluyendo diferentes tipos de flavonoides), pero la desventaja es que se requieren marcos de tiempo de 7 a 10 días. Es por ello que recientemente se han desarrollado métodos modernos de extracción para la extracción rápida y eficiente de los compuestos orgánicos a partir de matrices sólidas como la Extracción Asistida por Ultrasonidos (UAE) que se encuentra entre una de las más prometedoras para la extracción de los recursos de los productos naturales.

Los beneficios de la UAE se cree que se debe principalmente a los efectos mecánicos de cavitación acústica y ha demostrado recientemente el potencial de reducir significativamente los tiempos de extracción y aumentar los rendimientos estudios sobre plantas medicinales (Gómez, 2006).

Como se mencionó el propóleo tiene aproximadamente 300 compuestos que se han identificado por métodos cromatográficos, predominando los fenoles y flavonoides; a los que se les adjudica el efecto antimicótico, pero también se ha demostrado que existe un efecto sinérgico entre estos y otros componentes del extracto (Kartal, 2003).

Para revelar la presencia de fenoles se utilizó una disolución de cloruro férrico (FeCl_3). Los fenoles dan diferentes coloraciones debido a la formación de ciertos complejos de coordinación con el hierro.

Existen otros compuestos que también dan coloración con este reactivo como los ácidos hidroxámicos y los enoles. Ocasionalmente el color dado por un fenol con el cloruro férrico puede servir de ayuda para la determinación de la estructura. La pirocatequina y otros o-hidroxi derivados del benceno dan coloraciones verdes. El ácido salicílico da un color rojo intenso; muchos o-hidroxibenzaldehídos y cetonas dan colores que van del rojo al púrpura, más intensos que los fenoles sencillos (Geissman, 1974).

Las muestras de propóleo se observaron de color verde marrón a negro debido a que presentan una mezcla de fenoles y por lo tanto no se distingue un color en particular, sino la suma de todos ellos. La intensidad de color obtenido es proporcional al contenido de fenoles en la muestra. Los EEP de Morelos y Estado de México, obtuvieron las tonalidades más intensas dado que se trata de un método visual, no se distingue claramente una diferencia entre estas dos muestras, sin embargo, el contenido de fenoles en el EEP de Michoacán es claramente inferior.

Los flavonoides (quercetina, pinocembrina, apigenina, galangina, entre otras) y los ácidos fenólicos (caféico, isoferúlico, cinámico y benzoico) (Arvouet-Grand, 1994), además de ser tóxicos para las levaduras (Bariliak, 1996), inhiben la actividad enzimática de la hialuronidasa (Miyataka, 1997).

Respecto al contenido de flavonoides, se utilizó como prueba cualitativa el ensayo con hidróxido de sodio (NaOH) el cual reacciona con los flavonoides y las flavonas dando soluciones amarillas y anaranjadas principalmente. Los compuestos que tienen OH⁻ adyacentes tanto en el anillo A como en el B se descomponen dando color amarillo a rojo.

En este caso, se observó que las muestras del Estado de México y Morelos obtuvieron las tonalidades más intensas, observándose un color amarillo-anaranjado, mientras que el EEP de Michoacán se observó de color amarillo claro traslúcido.

Se realizó la determinación cuantitativa de fenoles por el método de Folin-Ciocalteu; los compuestos fenólicos reaccionan con el reactivo de Folin-Ciocalteu (tungstodifosfato y molibdofosfato) a pH básico, dando lugar a un complejo de coloración azul. El propóleo de Morelos (204.04 eq AG/g EEP) tuvo la concentración más alta de fenoles, seguido del Estado de México (154.34 eq AG/g EEP); mientras que el EEP de Michoacán (82.07 eq AG/g EEP) presentó el contenido de fenoles más bajo.

La determinación cuantitativa de flavonoides se realizó utilizando una disolución de tricloruro de aluminio. El principio de este método se basa en la reacción del cloruro de aluminio (AlCl₃) con los flavonoides en medio alcalino formando un complejo color amarillo. El aluminio forma quelatos con flavonoides o-dihidroxiados, 3- hidroxiados y 5- hidroxiados.

Los resultados obtenidos muestran que el propóleo de Morelos (7.56 µg quercetina/g EEP) presentó la concentración más alta de flavonoides, seguido del Estado de México (5.51 µg quercetina/g EEP); finalmente el EEP de Michoacán (2.01 µg quercetina/g EEP).

Se pueden confirmar que los resultados de las pruebas cualitativas se relacionan con el contenido de fenoles y flavonoides en las muestras. Pues en todos los casos se pudo identificar el propóleo con mayor y menor cantidad de estos compuestos.

Se determinó la efectividad del propóleo como inhibidor del crecimiento sobre *Cryptococcus neoformans* por el método de difusión en agar. Este método está basado en el estudio de la sensibilidad de los hongos a un antimicótico en función del halo de inhibición producido por la difusión del antimicótico en un medio de cultivo sólido (Cantón, 2007).

Los resultados indican que la mayor actividad antimicótica frente a *Cryptococcus neoformans* fue del EEP de Morelos con valores de CMI de 0.0781 mg/mL y CFM de 0.3125 mg/mL, seguido del Estado de México con CMI 0.1562 mg/mL y CFM de 0.625 mg/mL y el EEP de Michoacán una CMI de 0.3125 mg/mL y una CFM de 1.25 mg/mL.

En un estudio se reportó la actividad del extracto etanólico de propóleo contra 23 cepas de levaduras aisladas de diferentes partes del cuerpo humano, encontrando el efecto fungistático a una concentración de 0.13 mg/mL (Rojas, 1990). Otros autores reportaron que la concentración mínima fungicida del extracto etanólico de propóleo contra 15 cepas probadas fue de 0.12 a 0.60 mg/mL siendo, *Candida albicans*, *Candida tropicalis* y *Cryptococcus neoformans* las más susceptibles (Martins, 2002).

Burdock (1997) reporta un orden de toxicidad oral aguda bajo para el propóleo con una DL₅₀ que va de 2000 hasta 7300 mg/Kg en ratones; reportando además una dosis segura para seres humanos de 1.4 mg/Kg peso corporal al día, o aproximadamente 70 mg/día; lo cual refleja una buena seguridad para el empleo de propóleo.

Marccuci (1995) hizo un estudio donde menciona que la combinación de algunos antimicóticos con propóleo (10%) aumentaron su actividad sobre *Candida albicans*, teniendo el mayor efecto sinérgico cuando el propóleo fue añadido a los antimicóticos.

Aun cuando se han logrado importantes avances en la investigación acerca del propóleo en cuanto a su actividad biológica frente a hongos, es recomendable ampliar los estudios enfocados a la caracterización de este, incluyendo la identificación de los principios activos y determinar su mecanismo de acción, así como su efecto en otros hongos patógenos.

Además, es importante recordar que las pruebas *in vitro* no reflejan las condiciones reales encontradas en infecciones clínicas, si bien son de utilidad para poder realizar posteriormente estudios *in vivo*; por lo que son necesarios estudios adicionales.

9. CONCLUSIONES

1. Se recolectaron tres muestras de propóleos de diferentes Estados de la República: Estado de México, Michoacán y Morelos.
2. Las especificaciones físicas como color, aroma y sabor de los propóleos en greña y en extracto blando están mediados primordialmente por la vegetación que rodea a las colmenas.
3. El contenido de fenoles y flavonoides influyen y/o están ligados a la actividad antimicótica.
4. Se logró comprobar que la levadura *Cryptococcus neoformans* es susceptible al tratamiento con propóleo.
5. El propóleo puede ser un antimicótico natural a utilizar sin causar efectos tóxicos.

10. PERSPECTIVAS DEL PROYECTO

El interés de la población por los productos naturales sigue creciendo, lo que representa una oportunidad para comercializar ampliamente nuevos productos como el propóleo.

Es recomendable ampliar los estudios enfocados a la caracterización del propóleo, incluyendo la identificación de los compuestos por técnicas cromatográficas así como determinar su mecanismo de acción sobre *C. neoformans* y sobre otros hongos patógenos.

Es importante recordar que las pruebas *in vitro* son de utilidad para realizar posteriormente estudios *in vivo*, pero no reflejan condiciones reales encontradas en infecciones clínicas, por lo que son necesarios estudios adicionales con modelos animales para evaluar su efecto potencial *in vivo*.

Este trabajo abre la puerta a un campo muy virtuoso, por todas las propiedades que se saben del propóleo; presenta un campo de investigación planteando la posibilidad de presentar un sinergismo con algunos antimicóticos, con el fin de aplicarse como una terapia combinada mostrando mejores resultados.

11. REFERENCIAS

- Alves Ferreira, E. M. (2011). Caracterización antimicrobiana y fisicoquímica de propóleos de *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: apidae) de la región Andina Colombiana. *Acta Biológica Colombiana*, 16, 175-184.
- Arvouet-Grand A., V. B. (1994). Standardization of propolis extract and identification of principal constituents. *J Pharm Belg*, 49(6), 462-468.
- Ávalos García A., & P. (2009). Metabolitos secundarios de las plantas. *Serie Fisiología Vegetal*, 2, 119-145.
- Bariliak IR, B. G. (1996). The antimutagenic action of apiculture products. *Tsitol Genet*, 30(6), 48-55.
- Bonifaz, A. (2016). *Micología médica básica* (5a ed.). México: Mc Graw Hill.
- Burdock, G. A. (1997). Review of the Biological Properties and Toxicity of Bee Propolis. *Food and Chemical Toxicology*, 36, 347-363.
- Cantón, E. (2007). Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos. *Revista Iberoamericana de Micología*, M27-A3, M38-A y M44-A.
- Cartaya, O., & Reynaldo, I. (2001). Flavonoides: Características químicas y aplicaciones. *Cultivos tropicales*, 22, 5-14.
- Chil, N., Pavón, S., Galvéz, H., Cuéllar, C., & Ávila, B. (2002). Estudio de algunos parámetros para la caracterización del extracto blando de propóleos procedente de la región de Manzanillo como materia prima para la industria nacional. *Revista Cubana de Química*(16), 34-41.
- Devlin, T. (2006). *Bioquímica: libro de texto con aplicaciones clínicas* (4a ed.). España: Reverté.
- Farré, R., Frasquet, I., & Sánchez, A. (2004). Propolis and Human Health. *Ars Pharm*, 45(1), 21-43.
- García, A. (2009). Metabolitos secundarios de las plantas. *Serie fisiología vegetal*, 119-130.
- Geiissman, T. (1974). *Principios de Química Orgánica*. España: Reverté.
- Gómez Caravaca, A., Gómez Romero, M., Arráez Román, D., Segura Carretero, A., & Fernández Gutiérrez, A. (2006). Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41, 1220-1234.

- INAFED. (2015). *Instituto Nacional para el Federalismo y el Derecho Municipal*. Obtenido de <http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/>
- Kartal, M., Kaya, S., Kurucu, S., & Topcu, G. (2003). Antimicrobial activity of propolis samples from two different regions of Anatolia. *J. Ethnopharmacol*(86), 69-73.
- Lodoño Orozco, A., Ávila Acevedo, J., Canales Martínez, M., Hernández Delgado, C., Serrano, R., Flores Ortiz, C., Cruz Sánchez, T. (2010). Antibacterial comparative study extracts of Mexican propolis and of three plants wich use *Apis mellifera* for its production. *Journal of Animal an Veterinary Advances*, 9, 1250-1254.
- Lozina, L. P., Acosta, O., & Granero, G. (2010). Estandarización y caracterización organoléptica y fisicoquímica de 15 propóleos argentinos. *Latin American Journal of Pharmacy*, 29, 102-110.
- Marcucci, M. (1995). Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*, 26, 83-99.
- Martins, R. e. (2002). Effect commercial ethanol propolis extract on the in vivo growth of *Candida albicans* collected from HIV-seronegative Brazilian patients with oral candidiasis. *J Oral Sci*, 44(1).
- Mazuelos, E. M. (2010). Criptococosis: Diagnóstico microbiológico y estudio de la sensibilidad in vitro. *control Calidad SEIMC*.
- McMurry, J. (2012). *Química Orgánica* (8a ed.). México: Cengage Learning.
- Miyataka, H., Nishiki, M., Matsumoto, H., Fujimoto, T., Matsuka, M., & Satoh, T. (1997). Evaluation or propolis. Evaluation of Brazilian and Chinese propolis by enzymatic and physicochemical methods. *Biol Pharm bull*, 20(5), 496-501.
- Pico, R. M. (2015). Notiabeja. *SAGARPA*.
- Quintero Mora, M. L., Hernández Hernández, F., Manzano Gayosso, P., López Martínez, R., Soto Zárate, C., Carrillo Mirada, L., . . . Cruz Sánchez, T. (2008). Efecto de extractos de propóleos mexicanos de *Apis mellifera* sobre el crecimiento in vitro de *Candida Abicans*. *Revista Iberoamericana de Micología*, 25, 22-26.
- Ramírez, A. L. (2004). Abejas. *Imagen veterinaria*, 45-49.
- Rodríguez, B. (2015). *Perfil químico de propóleos mexicanos para su aplicación en Medicina Veterinaria. Tesis de Maestría*. México: Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM.

Tolosa, L., & Cañizares, E. (2002). Obtención, caracterización y evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos de Campeche. *Ars Pharmaceutica*, 43(1-2), 187-204.

Tsuji, O. V. (2005). Criptococosis. Historia natural y estado actual de tratamiento. *Acta Pediátrica de México*, 18-28.

Whalen, K. (2016). *Farmacología* (6 ed.). España: WoltersKluwer.

Zeiger, E. (2006). *Fisiología vegetal* (3 ed.). California: Universitat Jaume.

12. ANEXOS

Anexo 1. Preparación del EEP

PROCESO ANALÍTICO

- Pesar al menos 50 gramos de la muestra en la balanza analítica.
- Colocar la muestra en un matraz Erlenmeyer de 250 mL y adicionar etanol al 70% en una relación 1:3 (muestra/solvente), homogeneizar y proteger de la luz con papel aluminio.
- Se extrajo utilizando un proceso de maceración, por un período de 72 horas.
- Filtrar al vacío utilizando un embudo Buchner utilizando papel filtro Whatman.
- El filtrado se concentra en el Rotovapor a una temperatura de vapor de 27°C y temperatura de baño de 55°C y a una velocidad de 85 rpm.
- Se dejó por un periodo de 5 a 7 días a sequedad utilizando una bomba de vacío.
- Debe conservarse en refrigeración y protegida de la luz hasta el momento de realizar el análisis.

MANEJO DE RESIDUOS

Impurezas visibles, se eliminan en la basura municipal.

Etanol recuperado, se resguarda en contenedores plenamente identificados para su posterior utilización

Anexo 2. Prueba Cualitativa de Fenoles

Colocar 200 mg de los propóleos en bruto o EEP en un vaso de precipitados de 10 mL y añadir 1 mL de etanol al 70%.

Mezclar y agregar una gota de la solución de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ al 1% y observar el desarrollo de color.

MANEJO DE RESIDUOS

Neutralizar con abundante agua y desechar en el drenaje municipal.

Anexo 3. Prueba Cualitativa de Flavonoides

PROCESO ANALÍTICO

Pesar 200 mg de los propóleos en bruto o extracto blando y añadir 1 mL de etanol al 70% y mezclar perfectamente.

Añadir una gota de NaOH al 20% y observar un cambio de coloración.

Observar un cambio de coloración que va del amarillo a naranja de acuerdo a la cantidad de flavonoides presentes.

MANEJO DE RESIDUOS

Neutralizar con ácido y desechar en el drenaje municipal.

Anexo 4. Prueba Cuantitativa de Fenoles

Reacción del ácido gálico para la cuantificación de fenoles totales.

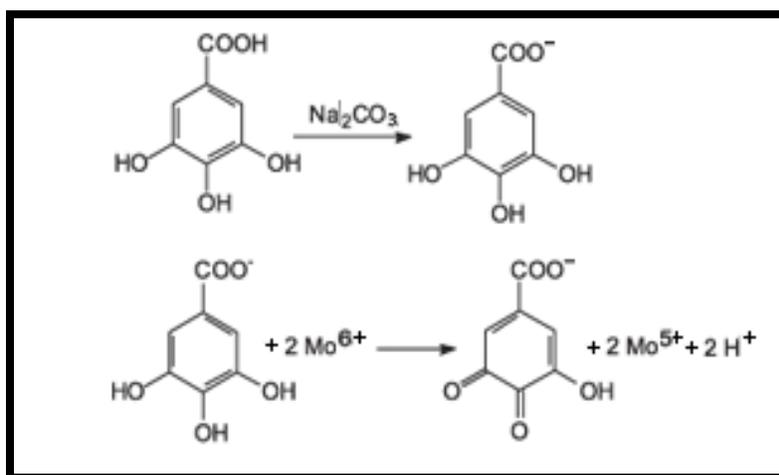


Imagen 28. Reacción de óxido-reducción del ácido gálico.

PROCESO ANALÍTICO

Preparación de la curva de calibración

A partir de la solución estándar de ácido gálico de 0.2 mg/mL, preparar una curva de calibración como se indica en la tabla:

Tabla 14. Preparación de la curva de fenoles.

	Concentración 1	Concentración 2	Concentración 3	Concentración 4	Concentración 5	Concentración 6
Estándar ácido gálico (μL)	31.25	62.5	125	250	500	1000
Diluyente agua destilada (μL)	968.5	937.5	875	750	500	--
Concentración final (mg /mL)	0.00625	0.0125	0.025	0.05	0.1	0.2
Volumen final	1 mL					

- Añadir 6 mL de agua destilada a cada sistema.
- Adicionar 500 μ L de reactivo de Folin-Ciocalteu y esperar 5 minutos.
- Adicionar 1.5 mL de la solución de Na_2CO_3 y aforar con agua destilada hasta un volumen de 10 mL.
- Esperar 2 horas a temperatura ambiente, para que se lleve a cabo la reacción y determinar la absorbancia a 760 nm en un espectrofotómetro de absorción UV-VIS.
- Repetir la misma operación para la muestra.

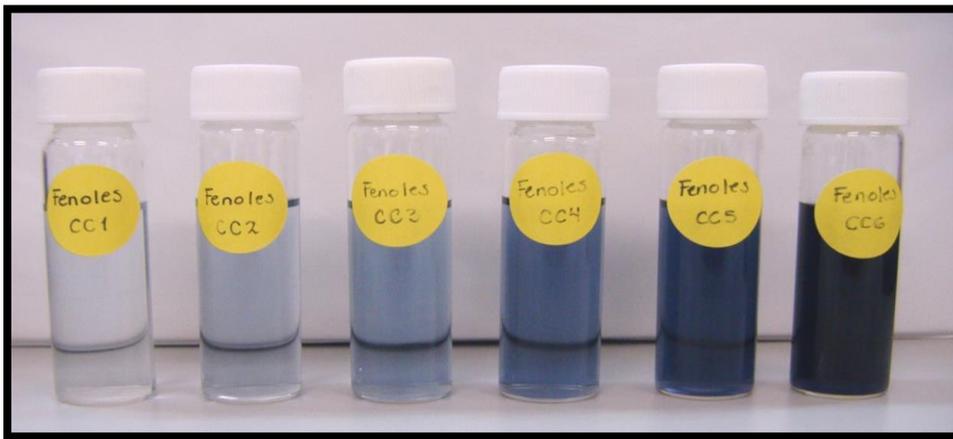
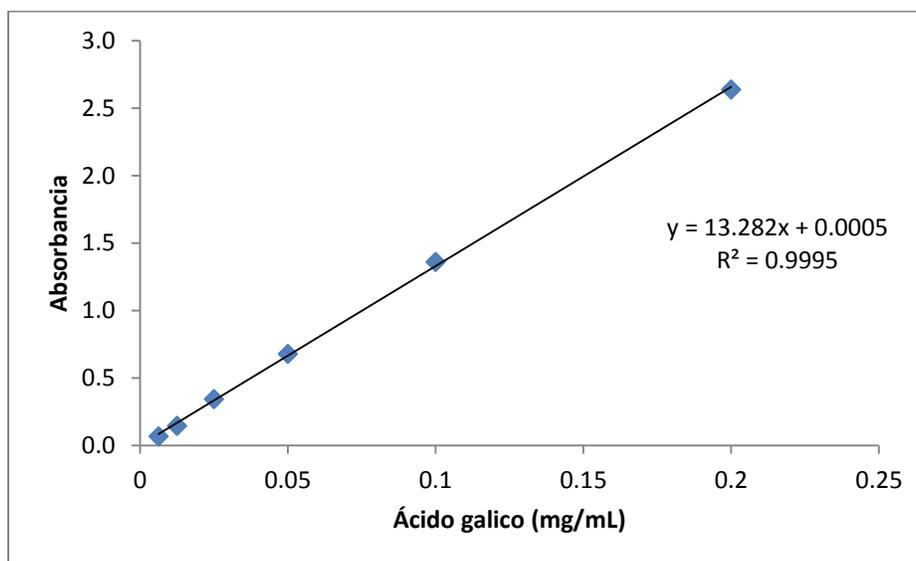


Imagen 29. Sistemas para la elaboración de la curva de ácido gálico.

CÁLCULOS

Graficar la concentración de ácido gálico contra la absorbancia para obtener la curva patrón.



Gráfica 6. Curva para cuantificación de fenoles

- Interpolar la lectura de absorbancia de la muestra en la curva de calibración.
- Los resultados se expresan como equivalentes de ácido gálico por cada gramo de extracto, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\frac{[\text{Concentración obtenida por interpolación (mg/mL)}] * 1000 \text{ mg de extracto}}{0.2 \text{ mg/mL (concentración inicial)}}$$

- En caso de que expresar los resultados en porcentaje, se utiliza la siguiente fórmula:

$$\frac{[\text{Concentración obtenida por interpolación (mg/mL)}] * 100\%}{0.2 \text{ mg/mL (concentración inicial)}}$$

MANEJO DE RESIDUOS

Neutralizar con abundante agua y desechar en el drenaje municipal.

Anexo 5. Prueba Cuantitativa de Flavonoides

Reacción de la quercetina con el tricloruro de aluminio.

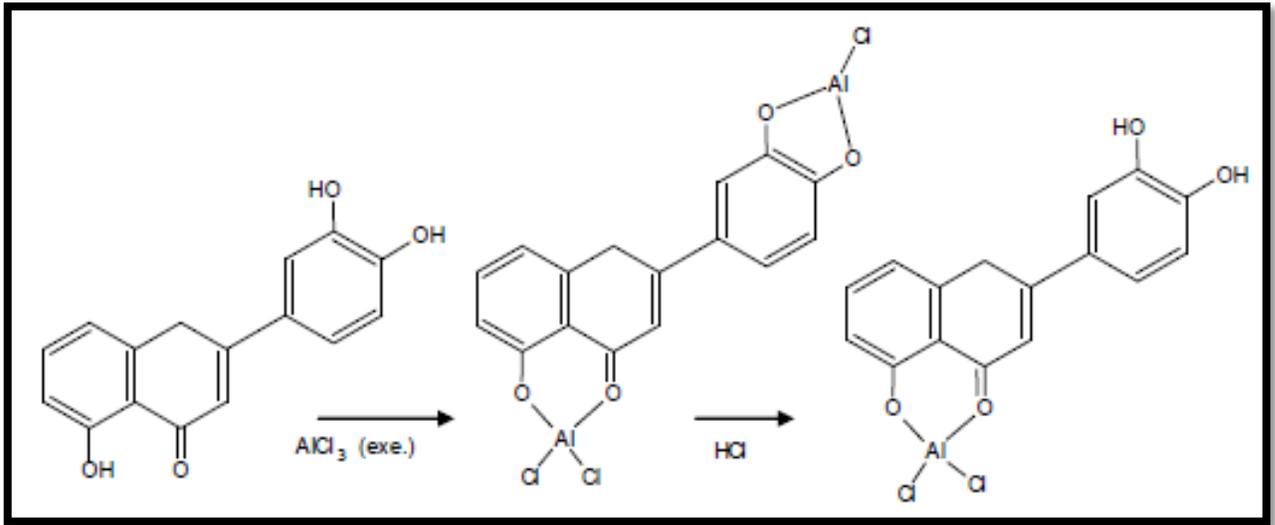


Imagen 30. Reacción de quelación del ion Al^{3+} con la quercetina

PROCESO ANALÍTICO

Preparación de la curva de calibración

A partir de la solución estándar de quercetina de 1 mg/mL, tomar alícuotas correspondientes para obtener concentraciones que se muestran a continuación:

Tabla 15. Preparación curva de flavonoides.

Estándar de quercetina (µL)	Diluyente MeOH (µL)	Concentración final (µg/mL)	Volumen final
3	2997	1	3 mL
6	2994	2	3 mL
9	2991	3	3 mL
12	2988	4	3 mL
15	2985	5	3 mL
18	2982	6	3 mL
21	2979	7	3 mL
24	2976	8	3 mL
27	2973	9	3 mL
30	2970	10	3 mL
60	2940	20	3 mL

Al tener todos los sistemas anteriores preparados, se procede de la siguiente manera:

Adicionar a cada tubo, 1 mL de la solución de AlCl₃, esperar 10 minutos a que se lleve a cabo la reacción.

Determinar la absorbancia a 415 nm por espectrofotometría de absorción UV-VIS.

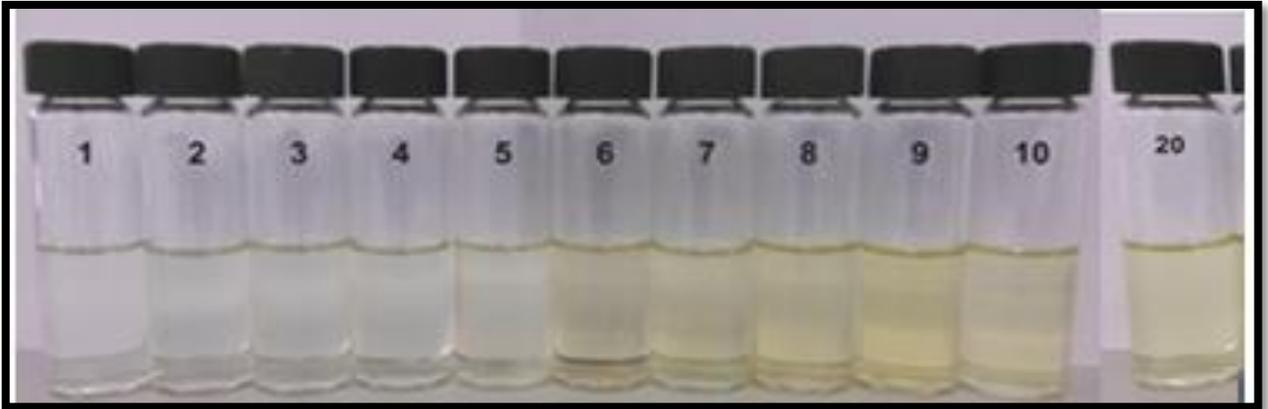
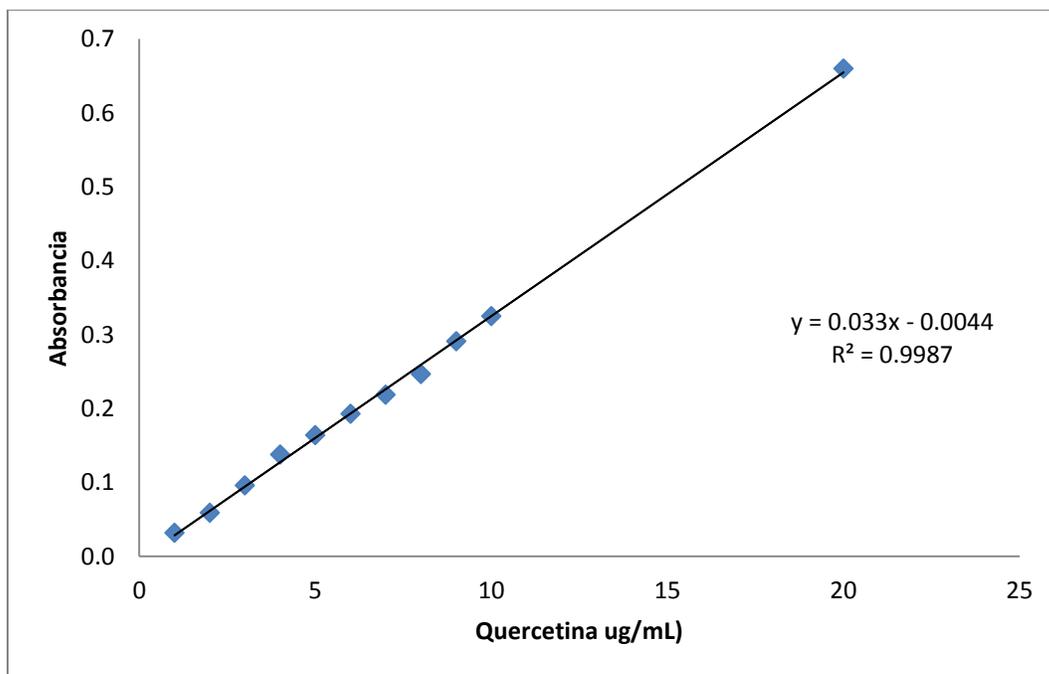


Imagen 31. Sistemas para la elaboración de la curva con quercetina.

CÁLCULOS

Graficar la concentración de quercetina contra la absorbancia para obtener la curva patrón.



Gráfica 7. Curva para la cuantificación de flavonoides

- Interpolarse la lectura de absorbancia de la muestra en la curva de calibración.

- Los resultados se expresan como equivalentes de quercetina/g de extracto, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\frac{[\text{Concentración obtenida por interpolación (mg/mL)}] * 1000 \text{ mg de extracto}}{0.05 \text{ mg/mL (concentración inicial)}}$$

En caso de que expresar los resultados en porcentaje, se utiliza la siguiente fórmula:

$$\frac{[\text{Concentración obtenida por interpolación (mg/mL)}] * 100\%}{0.05 \text{ mg/mL (concentración inicial)}}$$

MANEJO DE RESIDUOS

Almacenar y etiquetar correctamente para su posterior desecho con empresas autorizadas para la recolección de residuos.

Anexo 6. Prueba de difusión en agar

Metodología estandarizada por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antimicóticos.

CEPAS DE REFERENCIA

Cryptococcus neoformans, obtenida de una muestra clínica y proporcionada por el laboratorio 6 de Microbiología de la UIM.

PREPARACIÓN DE MUESTRAS, REACTIVOS, MEDIOS DE CULTIVO Y CONTROLES

Preparación de muestras

Pesar 50 miligramos del EEP y disolver en 100 μ L de etanol al 70%.

Preparación de sensidiscos

Se emplearán discos de papel Whatman N° 5, de 5 mm de diámetro (previamente esterilizados).

Los discos se impregnarán con 10 μ L de la solución de EEP (50 mg/100 μ L) para que tengan una concentración de 5 mg de EEP y se dejarán secar a temperatura ambiente por 24 horas.

Preparación de reactivos

Estándar N° 0.5 de MacFarland: añadir 500 μ L de sulfato de bario (BaSO_4) y aforar a 100 mL de H_2SO_4 al 0.36 N.

Solución Salina Fisiológica 0.85%: pesar 4.25 g de cloruro de sodio (NaCl), disolver en 500 mL de agua destilada.

Etanol al 70%: Medir 72.9 mL de alcohol etílico al 96% y aforar a 100 mL con agua destilada.

Solución azul metileno (5 mg/mL): Pesar 25 mg de azul metileno y disolver en 5 mL de agua destilada.

MEDIOS DE CULTIVO

Caldo Dextrosa Sabouraud.

Agar Müeller-Hinton (MH) suplementado con 2% de glucosa y 0.5 μ g/mL de azul de metileno.

Preparación de medios de cultivos

Para conservación y preparación del inóculo

Caldo o Agar Dextrosa Sabouraud (SDA), se prepara de acuerdo a especificaciones del proveedor.

Para el método de difusión en agar:

Agar Müeller-Hinton (MH) suplementado con 2% de glucosa y 0.5 µg/mL de azul de metileno como se indica a continuación:

Preparar el medio de MH siguiendo las indicaciones del fabricante y añadir 20 g de glucosa por litro de medio.

Añadir 100 µL de la solución de azul de metileno (5 mg/mL) por cada litro de medio.

Esterilizar en autoclave.

Preparación de controles

Control negativo: se emplearán discos impregnados con 10 µL de etanol al 70%.

Control positivo: se emplearon discos de antimicóticos de marca comercial.

PROCESO ANALÍTICO

Preparación de la suspensión de microorganismos

Tomar una asada de las colonias sembradas del microorganismo y sumergirla en 5 mL de caldo Müeller-Hinton.

Enjuagar bien en el líquido para descargar todo el material y retirar el asa.

El tubo de cultivo se incuba a 35°C/48 horas.

Ajustar la densidad del inóculo de acuerdo al tubo 0.5 del Nefelómetro de MacFarland (aproximadamente $1-5 \times 10^6$ células/mL) con SSF 0.85%.

La comparación de la turbidez se realiza a 625 nm en el espectrofotómetro y la absorbancia debe de ser entre 0.08 – 0.10 (Londoño, 2010).

Inoculación del microorganismo

A partir del inóculo con una concentración de $1-5 \times 10^6$ UFC/ mL, realizar con un hisopo estéril un sembrado masivo sobre las placas de agar MH suplementado.

Con ayuda de una aguja estéril, colocar los sensidiscos impregnados de la muestra de los propóleos procurando dejarlo en el centro de la caja.

Permitir que el sensidisco se adhiera a la placa de agar, teniendo la precaución de evitar desplazamientos del disco.

En caso de que se evalúen más de una muestra de propóleo en la misma caja, se recomienda dejar al menos 1.5 cm de distancia entre cada sensidisco y el borde de la caja.

Incubar a 35°C / 48 horas, se debe realizar una evaluación previa a las 24 horas.

Después del tiempo de incubación, con una regla calibrada de milímetros o de preferencia con un Vernier, medir el diámetro de los halos de inhibición.

La presencia de un halo de inhibición indica actividad antibacteriana y se reportará el diámetro de los halos de inhibición (en mm).

La ausencia de halo de inhibición indicará que no existe actividad antimicótica.

MANEJO DE RESIDUOS

Inactivar las cepas, desecharlas en bolsa roja y al incinerador.

Una vez utilizado este material ha de ser eliminado en un contenedor especial. Para después ser inactivado y esterilizado o incinerado, según los recursos del laboratorio.

Anexo 7. Prueba de CMI y CFM, estandarizados por el CLSI.

Metodología estandarizada por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antimicóticos.

CEPA DE REFERENCIA

Cryptococcus neoformans, aislada de una muestra clínica proporcionada por el laboratorio 6 de Microbiología de la UIM.

PREPARACIÓN DE MUESTRAS, REACTIVOS, MEDIOS DE CULTIVO Y CONTROLES

Preparación de muestras

Pesar 50 miligramos del EEP y disolver en 1000 μ L de etanol al 70% (solución stock). Seguir la imagen 32 para la dilución de las concentraciones del propóleo. Al terminar las diluciones todos los tubos tienen como volumen final 1 mL, excepto el tubo n° 10 (2 mL); de este se desecha 1 mL. En los tubos del 1 al 10 la concentración del propóleo es diez veces mayor a la concentración final deseada.

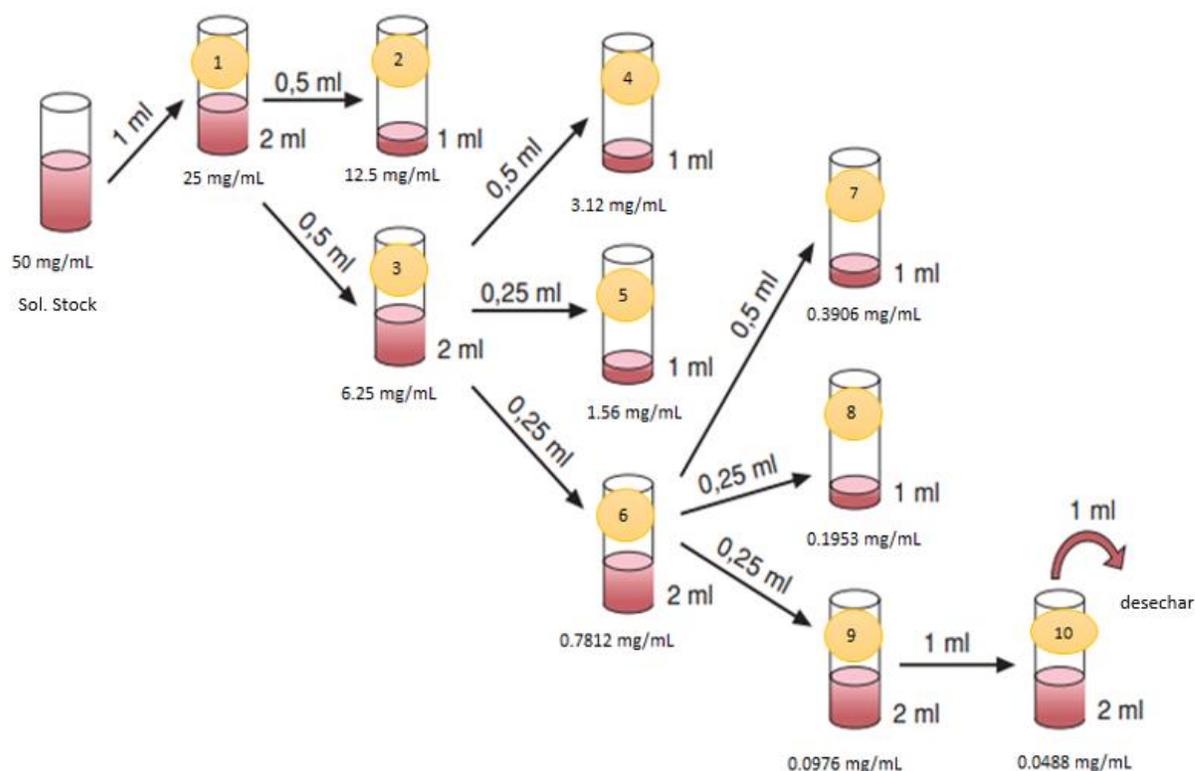


Imagen 32. Esquema para las diluciones del propóleo

Tabla 16. Preparación de las diluciones dobles seriadas de cada EEP.

Tubo	Concentración	Transferir	A un Tubo con ...	Concentración	Tubo
stock	50 mg/mL	1 mL	1 mL	25 mg/mL	1
1	25 mg/mL	0.5 mL	0.5 mL	12.5 mg/mL	2
1	25 mg/mL	0.5 mL	1.5 mL	6.25 mg/mL	3
3	6.25 mg/mL	0.5 mL	0.5 mL	3.12 mg/mL	4
3	6.25 mg/mL	0.25 mL	0.75 mL	1.56 mg/mL	5
3	6.25 mg/mL	0.25 mL	1.75 mL	0.7812 mg/mL	6
6	0.7812 mg/mL	0.5 mL	0.5 mL	0.3906 mg/mL	7
6	0.7812 mg/mL	0.25 mL	0.75 mL	0.1953 mg/mL	8
6	0.7812 mg/mL	0.25 mL	1.75 mL	0.0976 mg/mL	9
9	0.0976 mg/mL	1 mL	1 mL	0.0488 mg/mL	10

Preparación de reactivos

Estándar N° 0.5 de MacFarland: añadir 500 µL de sulfato de bario (BaSO₄) y aforar a 100 mL de H₂SO₄ al 0.36 N.

Solución Salina Fisiológica 0.85%: pesar 4.25 g de cloruro de sodio (NaCl), disolver en 500 mL de agua destilada.

Etanol al 70%: Medir 72.9 mL de alcohol etílico al 96% y aforar a 100 mL con agua destilada.

Solución azul metileno (5 mg/mL): Pesar 25 mg de azul metileno y disolver en 5 mL de agua destilada.

Preparación de medios de cultivos

Para conservación y preparación del inóculo

Caldo Dextrosa Sabouraud (SDA), se prepara de acuerdo a especificaciones del proveedor.

Para el método macrodilución de CMI y CFM:

Agar Müeller-Hinton (MH) suplementado con 2% de glucosa y 0.5 µg/mL de azul de metileno como se indica a continuación:

Preparar el medio de MH siguiendo las indicaciones del fabricante y añadir 20 g de glucosa por litro de medio.

Añadir 100 µL de la solución de azul de metileno (5 mg/mL) por cada litro de medio.

Esterilizar en autoclave.

Preparación del inóculo

Se prepara tocando con el asa de cultivo 5 colonias menores a un milímetro de diámetro y de 48 horas de incubación en agar SDA que se resuspenden en un tubo de solución salina (0.85%). Se agita bien y con ayuda del espectrofotómetro (longitud de onda 530 nm), se ajusta a una densidad óptica 0.5 McFarland, añadiendo la cantidad necesaria de solución salina. Esta solución tiene una concentración aproximada de 1×10^6 - 5×10^6 UFC/mL. Posteriormente se realiza una dilución 1:2000 con caldo SDA (concentración de 0.5×10^3 - 2.5×10^3 UFC/mL). Esta última dilución es la que se utilizó para la inoculación del sistema como se ve en la imagen 33.

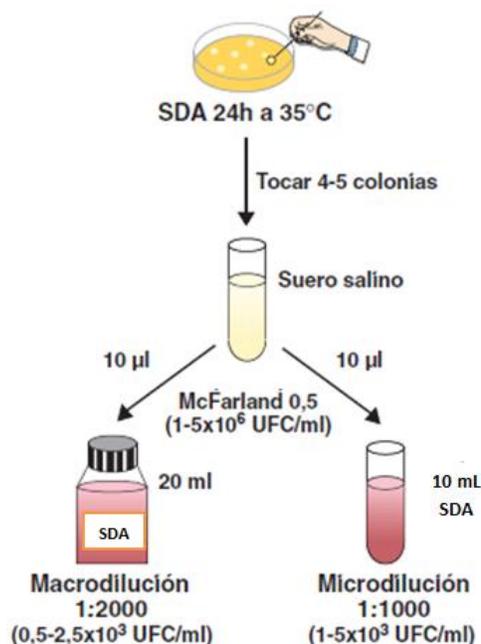


Imagen 33. Preparación del inóculo de *Cryptococcus neoformans*

Preparación del sistema propóleo-Cryptococcus

Se necesitan diez tubos estériles. Del tubo 1 al 10 se le añaden 0.1 mL de las concentraciones de propóleo preparadas anteriormente y se agregan 0.9 mL del caldo SDA inoculado con *Cryptococcus neoformans* el volumen final de cada tubo es de 1 mL, para así tener una nueva dilución 1/10 del propóleo, como se muestra en la imagen 34.

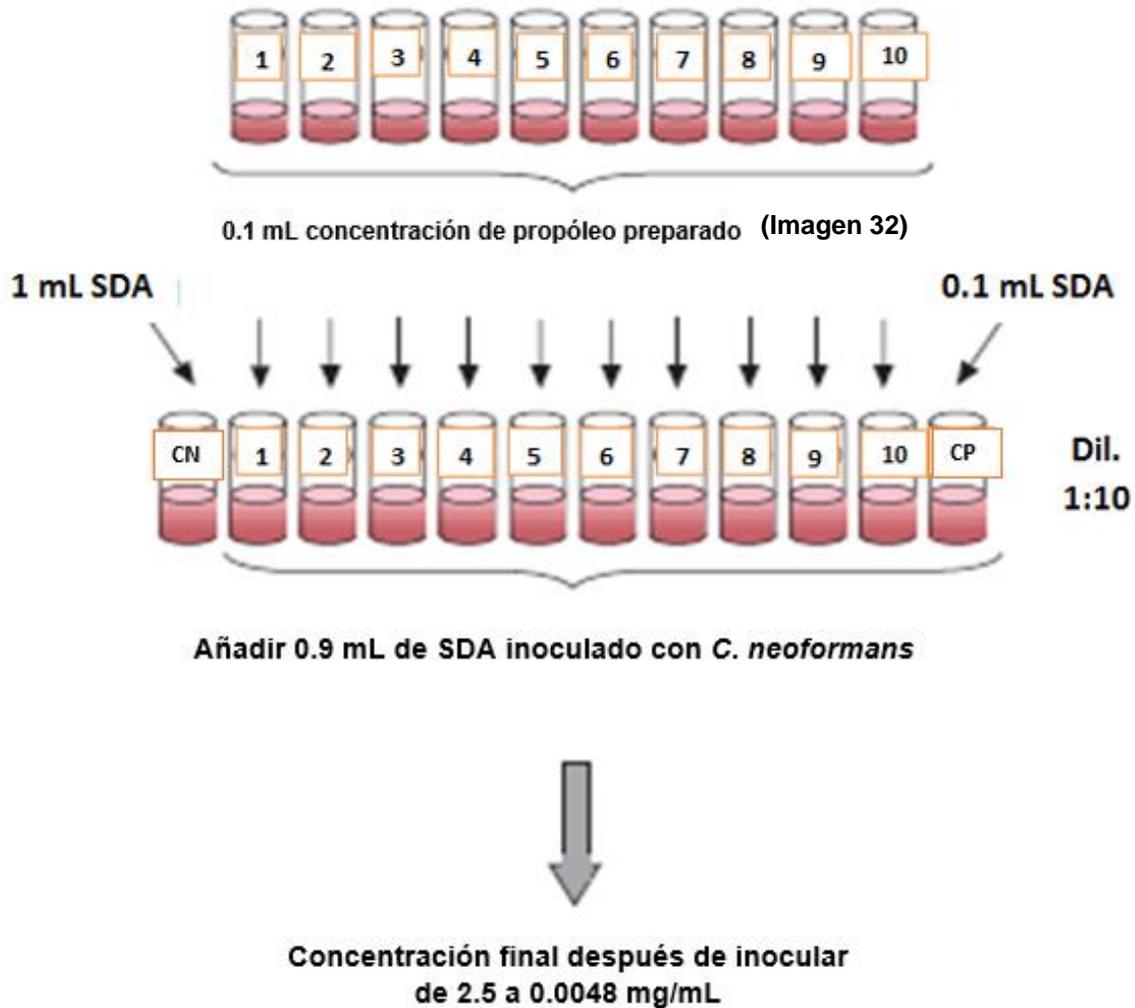


Imagen 34. Segundo paso de las diluciones de propóleo

Preparación de controles

Control negativo: agregar 1 mL de caldo SDA.

Control positivo: agregar 0.1 mL de caldo SDA (sin propóleo) y 0.9 mL de caldo SDA inoculado con *C. neoformans*.

PROCESO ANALÍTICO

Incubar el último sistema 48 horas.

Pasadas las horas de incubación homogenizar bien cada sistema, tomar 100 uL y sembrarlas en placas con divisiones (septadas); con ayuda de una varilla en forma de "L" estéril distribuir los 100 uL en toda la sección y así seguir con cada uno de los sistemas. Incubar 48 horas.

CÁLCULOS

Después del tiempo de incubación contar el número de colonias para determinar la CMI y la CFM.

MANEJO DE RESIDUOS

Inactivar las cepas, desecharlas en bolsa roja y al incinerador.

Una vez utilizado este material ha de ser eliminado en un contenedor especial. Para después ser inactivado y esterilizado o incinerado, según convenga al laboratorio.