



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES IZTACALA



UNIDAD DE BIOTECNOLOGÍA Y PROTOTIPOS

LABORATORIO DE FARMACOGNOSIA

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE UN
PROPÓLEO DE MICHOACÁN**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G A

PRESENTA:

MIRANDA RAMÍREZ MARICELA

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Ma. Margarita Canales Martínez

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México; 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

RECONOCIMIENTO

El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de Farmacognosia de la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO) en la Facultad de Estudios Superiores (FES) Campus Iztacala.

Fue dirigido por la Doctora María Margarita Canales Martínez.

Fue revisado por el siguiente jurado:

Dra. Ana Bertha Hernández Hernández.

Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monroy.

Dra. María Margarita Canales Martínez.

M. en C. Karla Stephanie Martínez Elizalde.

M. en C. Luis Barbo Hernández Portilla.

Para la realización de esta Tesis se contó con el apoyo de:

Financiamiento: UNAM-PAPIIT IN212317

Maricela Miranda Ramírez recibió la beca

Licenciatura/Conclusión de estudios

del proyecto UNAM-PAPIIT IN212317

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM, por darme los mejores 7 años de mi vida y dejarme crecer bajo las enseñanzas de grandes maestros.

A la FESI, por permitirme conocer a mis mejores amigos, desarrollarme y encontrar mi vocación.

A la Dra. Ma. Margarita Canales Martínez, por ser un gran apoyo y motivación. Gracias por la oportunidad maestra y no sólo por las enseñanzas, sino por todo el cariño y preocupación a mi persona. Gracias por tanto.

Al Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monroy, por las observaciones a mi trabajo y por todos los momentos de risas y diversión.

A la Dra. Ana Bertha Hernández Hernández, por todo el apoyo hacia mi trabajo, las enseñanzas y los buenos ratos. Gracias Ana, por siempre sacarnos una sonrisa.

A la M. en C. Karla Stephanie Martínez Elizalde, por las observaciones y apoyo en mi trabajo. Gracias maestra.

Al M. en C. Luis Barbo Hernández Portilla, por toda la ayuda brindada para la realización de este trabajo.

Al Biólogo Uriel Nava Solis, por la gran ayuda y todas las enseñanzas durante este año, las cuales fueron cruciales para la realización de este trabajo. Pero principalmente, gracias por tu amistad y atenciones y todos los buenos momentos en ese laboratorio.

Al equipo de Farmacognosia, muchas gracias a JP, Lalo, Bren, Lucero, Yatziri, Uriel, Hatziri, Rebe y Jenny; por todos los consejos, la ayuda, por volverse mucho más que un equipo de trabajo. Por todas las risas y los chistes malos (Lalo) que me hacían olvidar mis malos ratos.

Al equipo de Inmunobiología, a Mario, Tavo, Alma, Alonso, Pili, Dani, Ibran, Judith y Gus por todo el apoyo y buen ánimo en todo este tiempo.

A todos mis maestros, por compartir su pasión, conocimiento y sobre todo su tiempo.

DEDICATORIAS

A mi mamá. Quería que fueras la primera en leer esto, es por ti por quien estoy aquí hoy, gracias por siempre creer en mí y apoyarme en mis extraños planes. Por enseñarme, con tu ejemplo, a ser una mujer fuerte y comprometida con lo que pienso. Si hoy lo estoy cumpliendo es por todo ese apoyo y amor que aún me sigues dando. Siempre me harás falta, pero prometo llevarte en cada una de mis acciones. Te amo mamá.

A mi papá, gracias por todo tu amor y tus esfuerzos durante toda mi vida. Por darme una oportunidad cada vez que me equivocaba y seguir a mi lado sin importar qué. Gracias por enseñarme que tras cualquier éxito está todo el duro trabajo y esfuerzo. Ahora es mi turno, verás que lo haré muy bien. Te amo papá.

A Angie, por ser esa gran luz en mi vida, por todas tus sonrisas que me dan fuerzas para seguir intentando una y mil veces más. Continúa siempre siendo esa niña graciosa que a todo el mundo impresiona. Sigue esforzándote y persiguiendo lo que quieres, igual que ahora. Te amo demasiado y siempre estaré contigo.

A Fer, por ser mi compañero y cómplice desde el inicio, gracias por todo tu cariño, tu sinceridad, el apoyo y las palabras pronunciadas con miradas. Sabes que siempre estaré para apoyarte y quiero ver que hagas lo que realmente quieras hacer. Te amo hermano, estoy muy orgullosa de ti.

Mr. Roboto. Desde que llegaste no has dejado de apoyarme y hacerme reír. Me enseñaste que las expectativas que debo cumplir son las mías, intento ser mejor y quiero que lo veas. Sin ser tu responsabilidad me mantienes firme y con los pies en la tierra, siempre tienes tiempo, cariño y un gran abrazo para mí. Te quiero muchísimo Erik, más de lo que puedo escribir. Ya vienen más aventuras juntos.

A mis amigos Paoli, Américus, Ivonnes, Mariana, Rebe, Vale, Itzel, Lucero, Luis y Martita, por todas las risas, los buenos ratos y el bullying (principalmente a Pao). Por haber hecho de la Facultad la mejor experiencia. Y sobre todo por haberme acompañado aquella noche. Los amo amigos, muchas gracias.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
ANTECEDENTES	4
JUSTIFICACIÓN	5
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	5
HIPÓTESIS	5
OBJETIVOS	5
MATERIALES Y MÉTODOS	6
RESULTADOS	11
DISCUSIÓN	37
CONCLUSIONES	42
REFERENCIAS	42
ANEXOS	49

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Parámetros para determinar características organolépticas de los propóleos.....	6
Cuadro 2. Características organolépticas para un propóleo de Michoacán	11
Cuadro 3. Rendimiento de los extractos obtenidos del propóleo de Michoacán ...	11
Cuadro 4. Actividad antifúngica del propóleo sobre las 15 cepas de levaduras ...	12
Cuadro 5. Resultados de las pruebas de sensibilidad de las 8 cepas de hongos filamentosos frente a los 3 extractos de propóleo	14
Cuadro 6. Concentración fungicida media (CF ₅₀) y concentración fungicida mínima (CFM) del extracto metanólico del propóleo	15
Cuadro 7. Concentración fungicida media (CF ₅₀) y concentración fungicida mínima (CFM) de los extractos del propóleo sobre cepas de hongos filamentosos	16
Cuadro 8. Capacidad antioxidante media e índice de actividad antioxidante de los extractos metanólico, clorofórmico y estándar	18
Cuadro 9. Cuantificación de fenoles y flavonoides de los extractos metanólico y clorofórmico	19
Cuadro 10. Compuestos detectados en la cromatografía líquida de alta resolución del extracto metanólico a 280 nm	21
Cuadro 11. Compuestos detectados en la cromatografía líquida de alta resolución del extracto metanólico a 254 nm	23
Cuadro 12. Compuestos detectados en la cromatografía líquida de alta resolución del extracto metanólico a 365 nm	24
Cuadro 13. Compuestos detectados en la cromatografía líquida de alta resolución del extracto clorofórmico a 280 nm	25
Cuadro 14. Compuestos detectados en la cromatografía líquida de alta resolución del extracto clorofórmico a 365 nm	27
Cuadro 15. Compuestos presentes en el extracto metanólico de propóleo, detectados en el HPLC-MS.....	30
Cuadro 16. Compuestos presentes en el extracto clorofórmico de propóleo, detectados en el HPLC-MS.....	32
Cuadro 17. Compuestos presentes en el extracto hexánico de propóleo	34
Cuadro 18. Compuestos detectados por GC-MS del extracto hexánico de propóleo	36

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Halos de inhibición de 3 cepas distintas de <i>Candida</i>	13
Figura 2. Inhibición del crecimiento radial de los 3 extractos de propóleo sobre <i>T. mentagrophytes</i> CDBB-H-1112.....	14
Figura 3. Actividad del extracto metanólico de propóleo sobre curva de crecimiento de <i>Candida albicans</i> ¹ (caso clínico donada por el Laboratorio de Análisis clínicos de la FES Iztacala). CFM= 2.5 mg/mL, CF ₅₀ = 1.25 mg/mL y ½ CF ₅₀ = 0.625 mg/mL	17
Figura 4. Actividad del extracto metanólico de propóleo sobre curva de crecimiento de <i>C. albicans</i> ATCC 10231. CFM= 2.5 mg/mL, CF ₅₀ = 1.25 mg/mL y ½ CF ₅₀ = 0.625 mg/mL	18
Figura 5. Cromatograma de la cromatografía líquida de alta resolución del extracto metanólico de propóleo a 280 nm	20
Figura 6. Cromatograma de la cromatografía líquida de alta resolución del extracto metanólico de propóleo a 254 nm	22
Figura 7. Cromatograma de la cromatografía líquida de alta resolución del extracto metanólico de propóleo a 365 nm	23
Figura 8. Cromatograma de la cromatografía líquida de alta resolución del extracto clorofórmico de propóleo a 280 nm	25
Figura 9. Cromatograma de la cromatografía líquida de alta resolución del extracto clorofórmico de propóleo a 365 nm	26
Figura 10. Cromatograma de la Cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplada a Espectrometría de Masas del extracto metanólico de propóleo.....	29
Figura 11. Cromatograma de la Cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplada a Espectrometría de Masas del extracto clorofórmico de propóleo.....	31
Figura 12. Cromatograma de la Cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplada a Espectrometría de Masas del extracto hexánico de propóleo.....	33
Figura 13. Cromatograma de la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas del extracto hexánico de propóleo	35

ANEXOS

Anexo 1. Área de colecta	49
Anexo 2. Cinética de crecimiento de levaduras (Rivera, 2010).....	50

RESUMEN

Los antecedentes del propóleo reportan actividades biológicas debido a su contenido de compuestos fenólicos, como antibacteriana, antiinflamatoria, antitumoral, antioxidante, antifúngica, entre otras. El presente trabajo se enfocó en esta última característica.

Se colectaron 98.26g de propóleo de un apiario en el municipio de Zacapú, Michoacán, se obtuvieron tres extractos metanólico, clorofórmico y hexánico, por el método de maceración. Se realizaron las pruebas cualitativas con 14 cepas de levaduras y 8 de hongos filamentosos; las levaduras mostraron sensibilidad al extracto metanólico, *Trichophyton mentagrophytes* CDBB-H-1112 mostró una alta sensibilidad a los 3 extractos.

Con respecto a la CFM y CF_{50} ; con las levaduras se obtuvieron las concentraciones por cada cepa con el extracto metanólico, en 9 de las 14 cepas la CFM fue de ≤ 2.5 mg/mL; mientras que para los hongos filamentosos la prueba se realizó con los 3 extractos sobre *T. mentagrophytes*, obteniendo la CFM de 1.25mg/mL con los extractos metanólico y clorofórmico y de 5mg/mL con el hexánico. Se observó el efecto fungistático del extracto metanólico sobre *Candida albicans*. Además se midió su capacidad antioxidante media en el extracto metanólico ($CA_{50} = 13.3$ μ g/mL) y el clorofórmico ($CA_{50} = 1195.4$ μ g/mL).

Se cuantificaron los fenoles totales, donde el extracto metanólico presentó 620 mg (e AG)/g, mientras que el clorofórmico 20 mg (e AG)/g. Con la cuantificación de flavonoides totales, el extracto metanólico resultó con 10.63 mg(e Q)/g y el clorofórmico 4.88 mg (e Q)/g. Por HPLC se determinó la presencia de ácidos fenólicos, camferol, hidroxicumarinas, pinocembrina, flavonoles y acacetina para el extracto metanólico; flavonoles, pinocembrina, acacetina y fenoles simples para el clorofórmico. Por HPLC-MS se identificaron acacetina, pinocembrina, crisina y naringenina para los extractos metanólico y clorofórmico; y en el extracto hexánico, crisina, naringenina y pinocembrina. Finalmente en el GC-MS se reporta el contenido de hexacosano, eicosano y heptacosano para el extracto hexánico.

Palabras clave: propóleo, antifúngico, levaduriforme, filamentoso.

INTRODUCCIÓN

En México la medicina tradicional se ha convertido en una valiosa alternativa terapéutica para millones de mexicanos del medio rural debido a que la distancia a los centros urbanos impide el acceso a los servicios de atención médica. Además el conocimiento empírico avala su uso y debido a los resultados se hace indispensable conocer acerca de estos recursos con el fin de cubrir su demanda y evitar la depredación (Osuna *et al.*, 2005).

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud la medicina tradicional son los conocimientos, técnicas y procedimientos basados en las teorías, creencias y experiencias indígenas de diferentes culturas utilizados para el mantenimiento de la salud, así como la prevención, diagnóstico, o el tratamiento de enfermedades físicas y mentales. En ocasiones se emplean también los términos medicina complementaria/alternativa y no convencional (OMS, 2000).

Dentro de estas técnicas se encuentra la apiterapia, que es un tratamiento basado en el uso, individual o combinado, de los diferentes productos derivados o extraídos de la colmena, como la miel, polen, jalea real, apitoxina, cera y propóleo (Bellón y Calzadilla, 2007). El propóleo es un material que las abejas (*Apis mellifera* L.) procesan tras recoger con sus mandíbulas, partículas resinosas de las yemas, brotes y pecíolos de las hojas de diferentes vegetales, los cuales mezclan con cera y sus secreciones salivales para formar el propóleo (Farré *et al.*, 2004). Es empleado para la construcción de la colmena, mantener la humedad y la temperatura estables durante todo el año y para sellar grietas. A altas temperaturas es suave, flexible y pegajoso, mientras que al enfriarse se vuelve duro y quebradizo (Zabaiou *et al.*, 2017).

Históricamente el propóleo ha tenido diversos usos, los antiguos griegos y romanos lo empleaban para curar heridas y úlceras, además para sacar espinas y astillas, mientras que los persas lo usaron contra los eccemas, la mialgia y el reumatismo. Sin embargo en la Edad Media, el uso del propóleo desapareció, sólo pocos escritos detallan preparaciones utilizadas para infecciones orales y faríngeas y la caries. Afortunadamente el propóleo no se perdió de la medicina tradicional y su uso se retomó en el renacimiento, redescubriendo viejos tratamientos (Kuropatnicki *et al.*, 2013).

De acuerdo a Kuropatnicki *et al.*, 2013, la investigación sobre su composición química a principios del siglo XX y a lo largo de variadas investigaciones se han identificado como componentes del propóleo los alcoholes, aldehídos, aminoácidos, ácidos alifáticos, ácidos aromáticos, ésteres aromáticos, flavonoides, ácidos grasos,

ácidos *p*-cumáricos prenilados, ácidos cafeoilquínicos, lignanos, ácidos diterpénicos, triterpenos, esteroides y azúcares (Palomino *et al.*, 2009).

Esta variada composición ha ocasionado que el propóleo destaque como consecuencia de sus propiedades antibacterianas, antivirales, antiparasitarias, antioxidantes, anticancerígenas, antiinflamatorias y antifúngicas (León *et al.*, 2014). Esta complejidad química está relacionada a la flora de la región, la temporada, la forma de recolección, ya que las sustancias disponibles para la formación del propóleo son secretadas por las plantas y la composición de estas ocasiona la variabilidad en la composición química del propóleo (Bankova, 2005), además la cantidad y calidad de la extracción depende de la polaridad del disolvente utilizado. Dependiendo de la composición química de los compuestos a extraer, de la cantidad y factores como la concentración del solvente, temperatura, tiempo de contacto, entre otros (Soto-García y Rosales-Castro, 2016).

Los hongos son organismos heterótrofos, eucariotes con células alargadas, cuya composición de pared es de quitina, las cuales al alinearse unas con otras forman filamentos denominados hifas que al entrelazarse forman un micelio. A estos hongos se les denomina filamentosos. Mientras que otros pueden estar formados por una sola célula, denominados levaduras (Cuevas, 2016).

La función de los hongos en la naturaleza es la descomposición de la materia orgánica y la liberación de carbono, oxígeno, nitrógeno y fósforo al suelo y a la atmósfera. Además el hombre los ha aprovechado con múltiples usos, inicialmente como fuente de alimento y como elementos de decoración (Bonifaz, 2012). Sin embargo, en algunos casos los hongos pueden representar un daño a la salud del ser humano ya que causan padecimientos como alergias, debido a la hipersensibilidad a esporas o fragmentos de hifas; intoxicaciones al ingerir alimentos sobre los que crecieron hongos o infecciones, denominadas micosis, las cuales pueden ser superficiales, cutáneas, subcutáneas, sistémicas u oportunistas (Urribarren *et al.*, 2017),

En México el estudio de los padecimientos por hongos comenzó con algunos estudios sobre las tiñas y sus agentes etiológicos y ocasionalmente se reportaban casos clínicos sobre micosis profundas; sin embargo, fue hasta 1940 que las investigaciones tuvieron un seguimiento más estructurado tras la creación del Laboratorio de Micología en el Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales (González y González, 1960).

Además de un posible mal diagnóstico los inconvenientes con el tratamiento de infecciones por hongos son debido al desarrollo de mecanismos de resistencia a los antimicóticos, además de la administración inadecuada de medicamentos

fungistático, pues al prolongar el tratamiento por largos periodos de tiempo permiten la selección de clones resistentes (Alzate *et al.*, 2009). Igualmente muchas de estas micosis son infecciones oportunistas, lo que significa que se producen en enfermos con factores predisponentes, volviendo más complicado su tratamiento. También, los antifúngicos deben administrarse por corto tiempo por sus efectos tóxicos en células humanas, lo cual influye sobre su dosificación. Otro aspecto que complica el tratamiento de las micosis es que determinadas especies tienen la capacidad de desarrollar filamentos o formar biofilms, lo que dificulta la acción del antifúngico ya que actúa como barrera al afectar la diseminación del medicamento a capas más profundas (Cuenca-Estrella, 2010).

ANTECEDENTES

Se han realizado diversos trabajos acerca de las propiedades biológicas y composición química del propóleo en México.

- Londoño *et al.*, 2008, estudiaron la actividad antifúngica de un extracto etanólico de un propóleo proveniente del Estado de México sobre el crecimiento de *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, y *Aspergillus fumigatus*. Resultando en la observación de la actividad inhibitoria sobre el desarrollo de todos los hongos analizados.
- Quintero-Mora *et al.*, 2008, evaluaron el efecto de cuatro extractos etanólicos de propóleo de tres Estados del país y cuatro extractos comerciales sobre el crecimiento de *Candida albicans* ATCC 10231, obteniendo que el propóleo de Cuautitlán Izcalli, Estado de México presentó la mayor actividad biológica.
- Hernández, 2013 realizó una tesis de licenciatura donde implementó el método de cromatografía líquida de alta resolución para identificar y cuantificar flavonoides de tres extractos etanólicos de propóleos de los Estados de Aguascalientes, Colima y Estado de México. Se obtuvo pinocembrina en los 3 extractos y naringenina en los extractos de Aguascalientes y Estado de México.
- Martínez, 2013 estudió el efecto antimicótico del extracto etanólico de un propóleo de FES-Cuautitlán sobre el crecimiento de *Trichophyton mentagrophytes*, el cual presentó un efecto fungistático sobre el organismo de estudio.
- Silva, 2016 analizó la composición química de un extracto etanólico de un propóleo recolectado en Zacatecas, obteniendo el aislamiento de compuestos de tipo fenol y flavonoide, además se observaron actividades antibacterianas.

JUSTIFICACIÓN

El incremento de las micosis, las cepas fúngicas resistentes a los agentes antimicóticos y los efectos secundarios que éstos ocasionan en los pacientes son algunos de los indicadores de la necesidad de buscar y desarrollar nuevas alternativas que permitan un tratamiento antifúngico eficaz, cumpliendo con los requerimientos necesarios para el bienestar humano (Quintero-Mora *et al.*, 2008).

La investigación acerca de las propiedades del propóleo nos permite acercarnos más a los recursos que tradicionalmente son usados por aprendizaje empírico y de esta manera poder darles una base comprobable y obtener el mayor beneficio de recursos que podrían estar fácilmente al alcance de la población.

A partir del estudio de los extractos metanólico, clorofórmico y hexánico se pretende colaborar a la información existente de los propóleos mexicanos acerca de la actividad antifúngica (sobre levaduras y hongos filamentosos), su capacidad antioxidante, la cuantificación de fenoles y flavonoides y su composición química.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

Ya que la composición química del propóleo depende de diversos factores, como la región geográfica y la composición florística ¿los extractos clorofórmico, metanólico y hexánico de un propóleo de Michoacán presentarán actividad antifúngica sobre levaduras y hongos filamentosos?

HIPÓTESIS

Las plantas poseen compuestos naturales que aprovechan para su propia defensa, como es el caso de algunas sustancias antifúngicas, el propóleo está formado por diversas partículas vegetales y su función natural es el proteger a la colmena de bacterias y hongos; por lo tanto los extractos metanólico, clorofórmico y hexánico de un propóleo de Michoacán probablemente tendrán actividad antifúngica.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar la actividad antifúngica de los extractos hexánico, clorofórmico y metanólico de un propóleo de Michoacán.

Objetivos particulares

1. Determinar cualitativamente la actividad antifúngica (levaduras por el método de difusión en agar y hongos filamentosos por el método de inhibición del crecimiento radial).
2. Determinar la CF₅₀ (Concentración Fungicida media) y CFM (Concentración Fungicida Mínima); en levaduras por microdilución en caldo y en hongos filamentosos por microdilución en agar.
3. Determinar la actividad fungistática o fungicida en las levaduras (cinética de crecimiento).
4. Determinar la capacidad antioxidante (DPPH).
5. Determinar la concentración de fenoles totales (método modificado de Singleton) y flavonoides totales (método de Dowd).
6. Determinar la composición química (GC-MS, HPLC-DAD y HPLC-MS).

MATERIALES Y MÉTODOS

Características organolépticas.

Para la caracterización organoléptica del propóleo se consideraron las especificaciones de la Norma Oficial Mexicana de Propóleos, 2017.

Cuadro 1. Parámetros para determinar características organolépticas de los propóleos

Parámetros	Características
Color	Rojo, amarillo-rojizo, amarillo-oscuro, verde castaño, pardo o negro, variando conforme a su origen botánico.
Aroma	Resinoso (olor a madera) o balsámico (olor a cera), o balsámico, dependiendo de su origen botánico.
Sabor	Variable, de suave balsámico, a fuerte y picante, dependiendo de su origen botánico.
Consistencia	A temperatura ambiente maleable o rígido, dependiendo de su origen botánico.

Obtención de los extractos.

El propóleo en greña fue colectado el 16 de Noviembre de 2016 de un apiario ubicado en el Cerro La Mole, en el municipio de Zacapú, Michoacán (Anexo 1).

Para la elaboración de los extractos hexánico, clorofórmico y metanólico, el propóleo pasó por un proceso de limpieza con el fin de retirar cualquier impureza y posteriormente se trituró para facilitar la extracción. Posteriormente se pesó y los

extractos se obtuvieron por maceración, empleando los solventes de menor a mayor polaridad (Domínguez, 1973).

Cepas fúngicas

Se emplearon 22 cepas; 14 levaduras y 8 hongos filamentosos.

Levaduras

- *Candida albicans* ATCC 10231
- *Candida albicans* ATCC 14065
- *Candida albicans* ATCC 32354
- *Candida albicans* CDBB-L- 1003
- *Candida albicans*¹ (caso clínico) Laboratorio de Análisis clínicos de FES-I
- *Candida albicans*² (caso clínico)
- *Candida glabrata* CDBB-L-1536
- *Candida glabrata* CBS 138
- *Candida glabrata* (caso clínico)
- *Candida tropicalis* CDBB -L- 1098
- *Candida tropicalis*¹ (caso clínico) Hospital Los Ángeles
- *Candida tropicalis*² (caso clínico) FES-C
- *Candida tropicalis*³ (caso clínico) Facultad de Medicina
- *Cryptococcus neoformans* (caso clínico)

Hongos filamentosos

- *Fusarium moniliforme* CDBB - H- 265
- *Fusarium oxysporum*
- *Fusarium* sp.
- *Fusarium subglutinans*
- *Trichophyton mentagrophytes* CDBB-H-1112
- *Aspergillus* sp. Laboratorio de Microbiología, UBIPRO, FES-I
- *Aspergillus niger* CDBB-H-179
- *Rhizoctonia lilacina* CDBB-H-306

Evaluación cualitativa

El análisis cualitativo de la actividad antifúngica sobre levaduras se realizó por el método de difusión en agar (Anexo 2) con Agar Papa Dextrosa (PDA) y caldo Sabouraud, de acuerdo al cual se impregnan sensidiscos con 16 mg de cada extracto, adicionando como control positivo sensidiscos con 25 µg de Nistatina. Las cajas se incubaron a 36°C de 16-24 horas y se midió el diámetro del área (CLSI, 2012; NOM-003-SAG/GAN-2017).

En cuanto a los hongos filamentosos el análisis de sensibilidad fue por el método de inhibición del crecimiento radial en agar PDA. Se colocaron botones de micelio con un diámetro de 5 mm y 3 sensidiscos impregnados con 16 mg de cada extracto

a una distancia de 30 mm del límite micelial. Tras 72 horas de incubación a 35°C se revisaron las cajas, resultando sensibles a los extractos aquellas cepas que presentaron zonas de inhibición (Wang y Bun, 2002).

Evaluación cuantitativa

Se determinó la Concentración Fungicida Media (CF₅₀) y la Concentración Fungicida Mínima (CFM); en levaduras por microdilución en caldo en cajas de cultivo de 96 pozos, 50 µL de levaduras en caldo Sabouraud y 50 µL de las siguientes concentraciones del extracto (25.0, 20.0, 15.0, 10.0, 5.0 y 2.5 mg/mL), adicionando un grupo testigo sin el extracto y un grupo control negativo con el solvente empleado.

Los hongos filamentosos se analizaron por dilución en agar preparando tubos con una concentración definida del extracto y se le agregó a cada uno agar PDA, la mezcla se homogeneizó y se colocó en una caja de cultivo de 24 pozos. Se manejó el siguiente abanico de concentraciones (20.0, 15.0, 10.0, 5.0, 2.5 y 1.25 mg/mL). Las cajas se incubaron a 25°C de 18 a 24 horas.

Evaluación de la actividad fungistática o fungicida

Para determinar si los extractos presentan actividad fungistática o fungicida se realizó una cinética del crecimiento de levaduras sometidas a distintas concentraciones del extracto de propóleo (CF₂₅, CF₅₀, CFM) (Rivera, 2010) (Anexo 2).

Capacidad antioxidante

La capacidad antioxidante se determinó mediante el método de reducción del radical 2,2-difenil-1-picrilhidracil (DPPH), el cual es un radical libre que reacciona con compuestos antioxidantes (Guija-Poma *et al.*, 2015). Se empleó quercetina como referencia. El ensayo se realizó en una caja de cultivo de 96 pozos por triplicado. La absorbancia se midió a 517 nm en un lector de ELISA para obtener la capacidad antioxidante media (CA₅₀) (Okusa *et al.*, 2007).

Composición química

Se realizó su caracterización química mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución con Detector de Arreglo de Diodos (HPLC-DAD), una técnica utilizada para la separación, identificación y cuantificación de cada constituyente de una mezcla utilizando presiones elevadas (Thammana, 2016).

Bajo las siguientes condiciones

- Columna Discovery C-18 de 250 x 4.6 mm con un tamaño de película de 5 μm .
- Los extractos metanólico y clorofórmico se corrieron con una mezcla de metanol-acetonitrilo-agua (25.25:50)
- Flujo: 1 mL/min
- Detector de arreglo de diodos (DAD)
- Longitud de onda de 254nm, 280 nm y 365nm.

Cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplada a Espectrometría de Masas (HPLC-MS)

El análisis de las muestras se realizó mediante perfiles cromatográficos en HPLC acoplado a un espectrómetro de masas, empleando un equipo Agilent 1200 Infinity, acoplado al espectrómetro de masas Agilent 6230TOF con una fuente Agilent Dual ESI (ESISG14289023) y el software Mass Hunter Workstation, Versión B.05.01, Build 5.01.5125, operando con el modo de ionización negativa. El voltaje capilar fue de 4000 V; la temperatura del gas seco fue 250 ° C, se usó nitrógeno como gas seco a un caudal de 6 L/min; la presión del nebulizador fue de 60 psi, el fragmento fue de 200 V; El rango de MS fue 50-1300 m/z; La tasa de adquisición de MS fue de 1 espectro/s.

Se utilizó una columna Kinetex 2.6 μm , C1800Å (150 x 2.1 mm) (Phenomenex) mantenida a 25°C y una fase móvil en gradiente de dos líneas (disolventes A y B), donde A= Agua grado HPLC: Acetonitrilo grado HPLC: Ácido Fórmico (89:10:1) y B= Metanol grado HPLC: Acetonitrilo: Ácido Fórmico (89:10:1). El inicio de 3 minutos en una elución isocrática compuesta al 100% del disolvente A seguido de 3-11 min: 65% A-35% B; 11-20 min: 55% A-45% B; 20-35 min: 100% B; y 25 min: 100% B, v/v. El caudal fue de 0,2 mL/min y el volumen de inyección fue de 20 μL (3 mg / ml). Finalmente el cromatograma fue comparado con los estándares (Rivera-Yañez, 2017).

y Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS).

El equipo empleado presentó las siguientes características

- a) Cromatógrafo de Gases modelo 6850 y un Espectrómetro de Masas Modelo 5975 C, marca Agilent Technologies.
- b) Columna RTX 30 m de largo por 0.25 mm de diámetro interno y 25 micras de película.

Condiciones de corrida para el extracto hexánico:

- Temperatura del inyector: 250°C
- Modo de inyección: Split
- Radio: 33.5:1
- Purga de flujo de Split: 29.9 mL/mn
- Flujo de corrida: 35cm/seg

Horno

- Temperatura inicial: 70°C
- Rampa de calentamiento: 15°C por minuto hasta 290°C, se mantiene 6 minutos.
- Tiempo de corrida total: 35.00 minutos
- Línea de transferencia: 290°C

Detector del Espectrómetro de Masas:

- Método de adquisición de datos: Full Scan
- Rango de masas: 35-600 m/z

Cuantificación de fenoles totales

Los fenoles fueron cuantificados mediante el método modificado de Singleton, técnica que a partir de la espectrofotometría se mide una reacción colorimétrica con el reactivo de Folin-Ciocalteu a 760 nm, cada concentración se analizó por triplicado. La referencia fue el ácido gálico a una concentración de 0.2mg/mL, los resultados se expresaron como equivalentes de ácido gálico (eAG) (Singleton *et al.*, 1999).

Cuantificación de flavonoides totales

Se empleó el método de Dowd para la cuantificación de flavonoides totales. Se basa en el uso de tricloruro de aluminio (AlCl₃) al 2% en metanol (Amaya y Portillo, 2013). Las absorbancias se leen a 415 nm, el contenido de flavonoides totales se determinó usando una curva patrón de quercetina, los resultados se expresaron como equivalentes de quercetina (eQ) (Ramamoorthy y Bono, 2007).

RESULTADOS

- Características organolépticas.

De forma cualitativa se determinaron las características organolépticas del propóleo de Michoacán (Cuadro 2).

Cuadro 2. Características organolépticas para el propóleo de Michoacán.

Características organolépticas	
Color	Pardo a negro
Aroma	Resinoso (tamarindo)
Sabor	Imperceptible casi nulo (cera)
Consistencia	Maleable

- Rendimiento del propóleo.

Se colectaron y pesaron 98.26 gramos de propóleo, a partir del cual se calculó el rendimiento de cada extracto. El mayor rendimiento se obtuvo para el extracto clorofórmico (Cuadro 3).

Cuadro 3. Rendimiento de los extractos obtenidos del propóleo de Michoacán.

Extracto	Rendimiento (g)	Rendimiento (%)
Hexánico	17.34	17.64
Clorofórmico	54.647	57.65
Metanólico	13.988	14.24

- Pruebas cualitativas de la actividad antifúngica

Los halos de inhibición obtenidos tras la exposición de los hongos levaduriformes a los diferentes extractos del propóleo y del grupo control positivo (Nistatina) se muestran en el cuadro 4.

Cuadro 4. Actividad antifúngica del propóleo sobre las 15 cepas de levaduras.

Cepa	Nistatina	Metanólico	Clorofórmico	Hexánico
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	7.66 ± 1.15	6.33 ± 0.58	5.0 ± 0	5.0 ± 0
<i>C. albicans</i> ATCC 14065	11.33 ± 2.31	6.0 ± 0	5.0 ± 0	5.0 ± 0
<i>C. albicans</i> ATCC 32354	12.67 ± 1.58	6.0 ± 0	5.0 ± 0	5.0 ± 0
<i>C. albicans</i> CDBB-L- 1003	11 ± 1.73	6.0 ± 0	5.0 ± 0	5.0 ± 0
<i>C. albicans</i> ¹	10.0 ± 0	6.67 ± 0.58	5.0 ± 0	5.0 ± 0
<i>C. albicans</i> ²	12.33 ± 5.69	6.0 ± 0	5.0 ± 0	5.0 ± 0
<i>C. glabrata</i> CDBB-L-1536	7.66 ± 1.15	6.33 ± 0.58	5.0 ± 0	5.0 ± 0
<i>C. glabrata</i> CBS 138	10.0 ± 1.0	5.0 ± 0	5.0 ± 0	5.0 ± 0
<i>C. glabrata</i> ¹	10.33 ± 3.06	6.67 ± 0.58	5.0 ± 0	5.0 ± 0
<i>C. tropicalis</i> CDBB-L- 1098	10.33 ± 1.53	6.0 ± 0	5.0 ± 0	5.0 ± 0
<i>C. tropicalis</i> ¹	11.0 ± 1.0	6.33 ± 0.58	5.0 ± 0	5.0 ± 0
<i>C. tropicalis</i> ²	9.66 ± 1.53	6.0 ± 0	5.0 ± 0	5.0 ± 0
<i>C. tropicalis</i> ³	11.0 ± 1.73	7.0 ± 1.73	5.0 ± 0	5.0 ± 0
<i>C. neoformans</i>	8.66 ± 2.31	6.0 ± 1.0	5.0 ± 0	5.0 ± 0

Sensidiscos con una concentración de 16 mg/mL para los extractos y 25 µg/10 µL para el control positivo (nistatina). Halos de inhibición reportados en milímetros y desviación estándar.

En el cuadro 4, se muestran los resultados de las pruebas de sensibilidad de los hongos levaduriformes; se puede observar que los halos con mayor diámetro se presentaron con la Nistatina en las cepas de *C. albicans*, sin embargo, los hongos también muestran sensibilidad al extracto metanólico, particularmente el caso clínico de *C. albicans*¹, *C. tropicalis*³ y *C. glabrata*¹ manifiestan la mayor inhibición con este extracto.

Para los extractos clorofórmico y hexánico se observó la formación de halos muy pequeños del tamaño del diámetro de los sensidiscos.

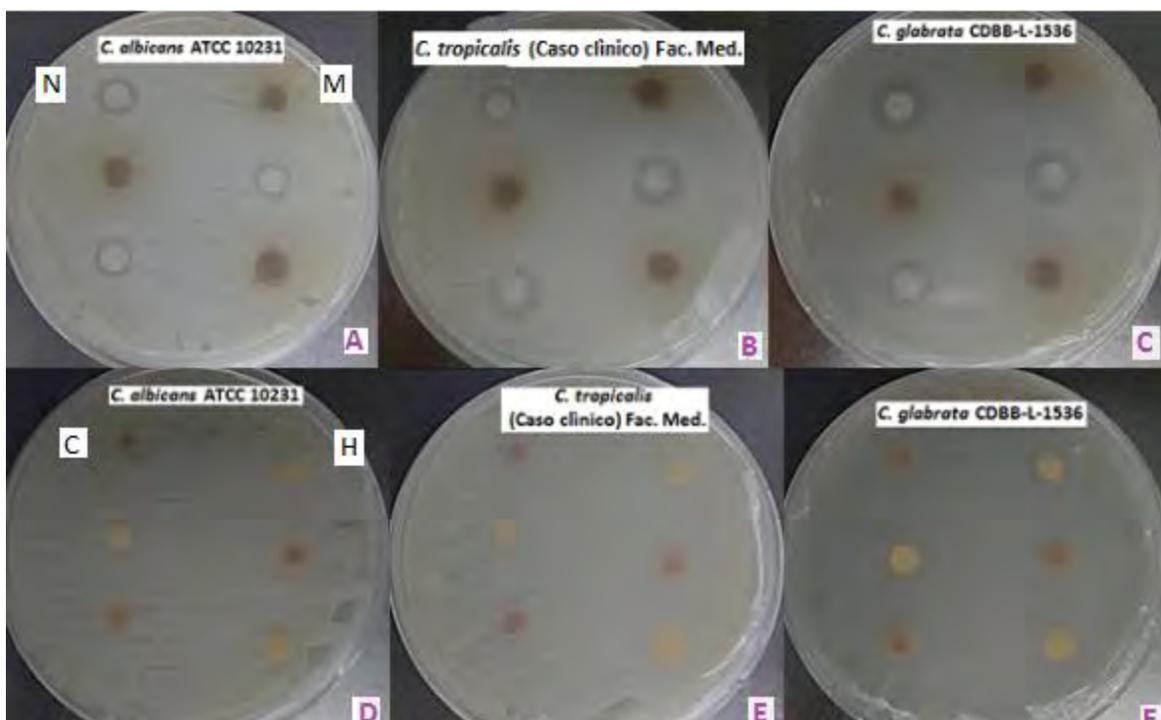


Figura 1. Halos de inhibición de 3 cepas distintas de *Candida*.

C. albicans ATCC 10231 (A y D), *C. tropicalis* (caso clínico) (B y E) y *C. glabrata* CDBB-L-1536 (C y F). De A a C se probó el grupo de extracto metanólico (M) y el grupo control con nistatina (N) y de D a F son extracto clorofórmico (C) y hexánico (H).

En el cuadro 5 se muestra la sensibilidad de los hongos filamentosos a los tres extractos de propóleo, se observó la deformación del crecimiento del micelio. La x indica que no hubo inhibición ya que el micelio creció sobre el sensibilizador, los + indican inhibición y estos aumentan según el incremento de deformación del crecimiento micelial, llegando hasta +++ como una deformación total que indica una inhibición alta (Figura 2).

El extracto metanólico presentó la mayor cantidad de cepas sensibles al propóleo, es decir con una deformación total del crecimiento micelial, exceptuando *F. moniliforme* CDBB-H-265, *Aspergillus* sp. y *A. niger* CDBB-H-179. *T. mentagrophytes* CDBB-H-1112 y *Fusarium* sp. presentaron +++ en los tres extractos, *R. lilacina* CDBB-H-306 y *F. subglutinans* no mostraron sensibilidad frente al extracto clorofórmico, igualmente esta última cepa frente al extracto hexánico (Figura 2).

Cuadro 5. Resultados de las pruebas de sensibilidad de las 8 cepas de hongos filamentosos frente a los 3 extractos de propóleo.

Cepa	Metanólico	Clorofórmico	Hexánico
<i>F. moniliforme</i> CDBB -H- 265	++	++	++
<i>F. oxysporum</i>	+++	+++	++
<i>Fusarium</i> sp.	+++	++	+++
<i>F. subglutinans</i>	+++	X	X
<i>T. mentagrophytes</i> CDBB-H-1112	+++	+++	+++
<i>Aspergillus</i> sp.	+	+	+
<i>A. niger</i> CDBB-H-179	+	+	+
<i>R. lilacina</i> CDBB-H-306	+++	X	++

X: no hubo inhibición; +: poca inhibición; ++: inhibición moderada; +++: inhibición alta.

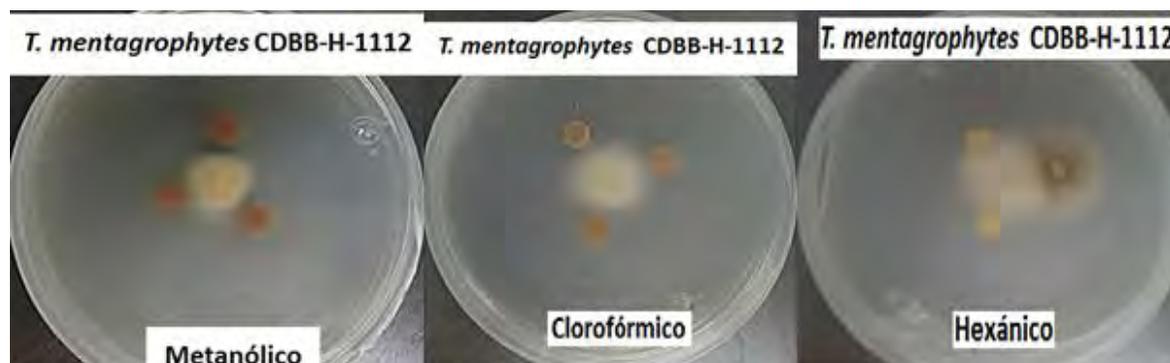


Figura 2. Inhibición del crecimiento radial de los 3 extractos de propóleo sobre *T. mentagrophytes* CDBB-H-1112.

- Pruebas cuantitativas

Los resultados de la CFM y CF₅₀ en hongos levaduriformes se obtuvieron únicamente para el extracto metanólico ya que frente a éste se presentaron los mayores halos de inhibición en la prueba cualitativa (Cuadro 6).

En el cuadro 6 se observa que se obtuvo una CFM de 2.5 mg/mL en *C. albicans*¹ y *C. albicans* ATCC 14065; de 15.0 mg/mL en *C. albicans* ATCC 32354, 3 cepas de

C. tropicalis y *C. albicans* ATCC 10231 y de 25 mg/mL en *C. glabrata* CDBB-L-1536.

Para la obtención de la CFM y CF₅₀ en hongos filamentosos se realizó la prueba sobre *T. mentagrophytes* CDBB-H-1112 ya que en las pruebas cualitativas fue la cepa que presentó una mayor deformación del crecimiento micelial con los tres extractos.

Cuadro 6. Concentración fungicida media (CF₅₀) y concentración fungicida mínima (CFM) del extracto metanólico del propóleo.

Cepa	Testigo	25 mg/mL	15 mg/mL	2.5 mg/mL	CF ₅₀ mg/mL	CFM mg/mL
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	1x10 ¹²	5.56x10 ³	0	7.08x10 ⁴	2.5	15.0
<i>C. albicans</i> ATCC 14065	1.28x10 ⁷	0	0	0	<2.5	2.5
<i>C. albicans</i> ATCC 32354	2.36x10 ⁶	0	0	2.33x10 ²	2.5	15.0
<i>C. albicans</i> CDBB-L- 1003	1.11x10 ⁷	5.14x10 ⁶	2.78x10 ⁵	1.67x10 ⁶	>25.0	>>25.0
<i>C. albicans</i>¹	1.24x10 ⁷	33.33	0	0	<2.5	2.5
<i>C. albicans</i>²	1x10 ¹²	3.19x10 ⁶	1.67x10 ⁶	1x10 ¹²	15.0	>25.0
<i>C. glabrata</i> CDBB-L-1536	1x10 ¹²	0	2.78x10 ³	2.78x10 ⁴	<2.5	25.0
<i>C. glabrata</i> CBS 138	1x10 ¹²	2.78x10 ⁶	2.36x10 ⁶	1.24x10 ⁷	15.0	>25.0
<i>C. glabrata</i>	1x10 ¹²	9.72x10 ³	9.72x10 ³	1x10 ¹²	□2.5 <15.0	>25.0
<i>C. tropicalis</i> CDBB-L- 1098	1x10 ¹²	0	1.8x10 ⁴	5.56x10 ³	<2.5	25.0
<i>C. tropicalis</i>¹	1x10 ¹²	0	0	5.56x10 ⁴	<2.5	15.0
<i>C. tropicalis</i>²	1x10 ¹²	0	0	2.33x10 ²	<2.5	15.0
<i>C. tropicalis</i>³	1.01x10 ⁷	1.39x10 ³	0	5.56x10 ⁵	2.5	15.0
<i>C. neoformans</i>	3.47x10 ⁶	8.33x10 ⁵	2.64x10 ⁶	1.83x10 ⁷	>25.0	>>25.0

Se reporta 1x10¹² UFC como valor aproximado, para indicar aquellas que no fue posible contar debido al gran número de colonias.

En el cuadro 7 se muestra que, de acuerdo a los porcentajes de inhibición del crecimiento radial de *T. mentagrophytes*, la CFM es de 1.25 mg/mL para el extracto metanólico y clorofórmico. La cepa resultó menos sensible ante el extracto hexánico con una CFM de 5 mg/mL.

Cuadro 7. Concentración fungicida media (CF₅₀) y concentración fungicida mínima (CFM) de los extractos del propóleo sobre cepas de hongos filamentosos.

	Metanólico	Clorofórmico	Hexánico
CF₅₀ (mg/mL)	<1.25	<1.25	<2.5 >1.25
CFM (mg/mL)	1.25	1.25	5.0

- Actividad del extracto metanólico del propóleo sobre la curva de crecimiento de levaduras.

Los resultados de la actividad extracto metanólico en 3 concentraciones diferentes (CF₅₀, 1/2 CF₅₀, y CFM), además de un grupo testigo (sin tratamiento alguno), sobre 2 cepas de *Candida albicans* (un caso clínico y ATCC 10231), se muestran en las figuras 3 y 4.

La figura 3 muestra el crecimiento por 48 horas de *Candida albicans*¹ al ser expuesta a las concentraciones. El grupo testigo continuó su proliferación como era esperado durante todo el experimento, al comparar a los tratamientos con este grupo se observa que la concentración de 2.5 mg/mL (CFM) alcanzó las 0 UFC a partir de las 8 horas y a las 28 horas presentó crecimiento, el cual regresó a 0 al finalizar el experimento. Esta situación igualmente se presenta con la concentración de 1.25 mg/mL (CF₅₀), ya que a partir de las 12 horas no se contabilizó crecimiento, posteriormente a las 24 se observaron UFC y desde las 32 horas y hasta concluir el experimento no hubo crecimiento.

A pesar de que la 1/2 CF₅₀ (0.625 mg/mL) no alcanzó las 0 UFC, sus valores se mantuvieron por debajo del grupo testigo y disminuyeron a lo largo del experimento a partir del valor inicial.

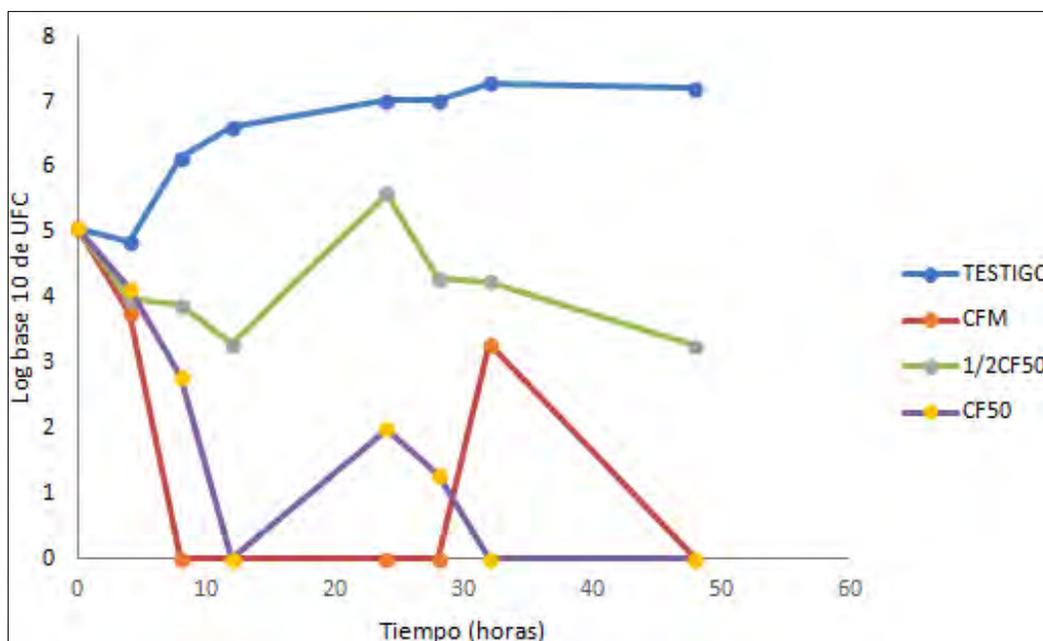


Figura 3. Actividad del extracto metanólico de propóleo sobre curva de crecimiento de *Candida albicans*¹ (caso clínico donada por el Laboratorio de Análisis clínicos de la FES Iztacala). CFM= 2.5 mg/mL, CF₅₀ = 1.25 mg/mL y ½ CF₅₀ = 0.625 mg/mL.

En la figura 4 se muestra que el crecimiento del grupo testigo de *Candida albicans* ATCC 10231 fue superior a los de las concentraciones del extracto. La CFM (2.5 mg/mL) fue la concentración donde se obtuvo mayor decaimiento en la formación de colonias; a pesar de que con la CF₅₀ y 1/2 CF₅₀ se presentó crecimiento, este siempre estuvo por debajo del grupo testigo.

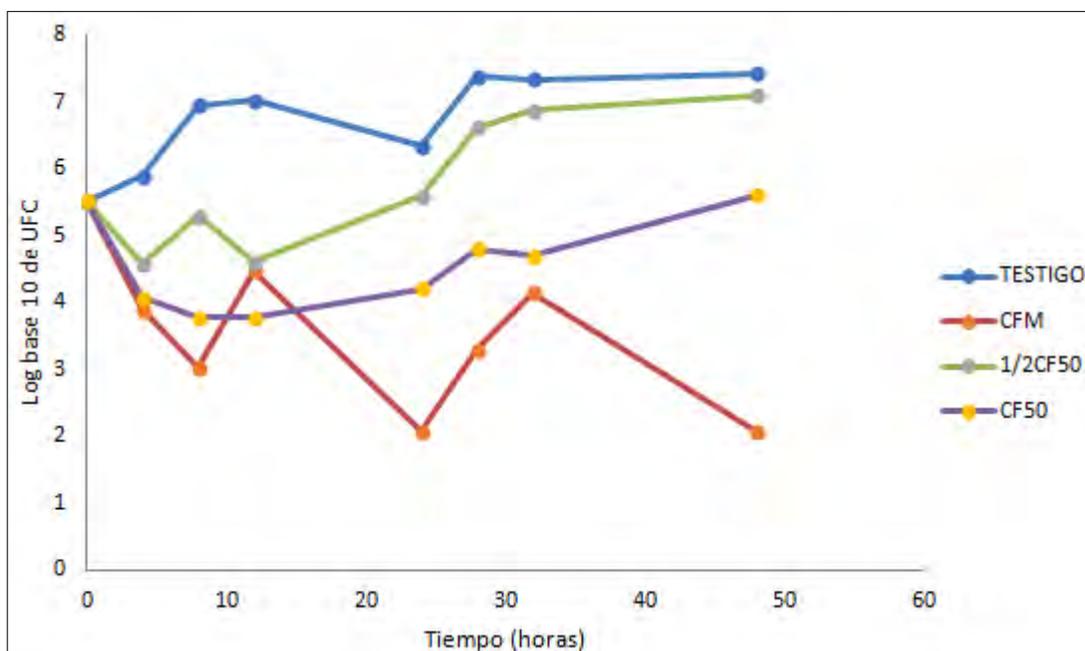


Figura 4. Actividad del extracto metanólico de propóleo sobre curva de crecimiento de *C. albicans* ATCC 10231. CFM= 2.5 mg/mL, CF₅₀ = 1.25 mg/mL y ½ CF₅₀ = 0.625 mg/mL.

- Capacidad antioxidante

Los resultados de la capacidad antioxidante media se muestran en el cuadro 8. Además el Índice de Actividad Antioxidante (AAI) (Scherer y Teixeira, 2009), con el cual se determinó que la capacidad antioxidante del extracto metanólico es muy fuerte, mientras que la del clorofórmico es pobre.

Cuadro 8. Capacidad antioxidante media e índice de actividad antioxidante de los extractos metanólico, clorofórmico y estándar.

Extracto/estándar	CA ₅₀	AAI
Metanólico	13.3 µg/mL	2.25
Clorofórmico	1195.4 µg/mL	0.025
Quercetina	6.55 µg/mL	4.58

Criterio	Índice de Actividad Antioxidante
Pobre actividad	AAI <0.5
Moderada	AAI 0.5 - 1.0
Fuerte	AAI 1.0 – 2.0
Muy fuerte	AAI >2.0

- Cuantificación de fenoles y flavonoides totales

Se procedió con la cuantificación total de fenoles y flavonoides en los extractos metanólico y clorofórmico, los resultados se muestran en el cuadro 9.

Cuadro 9. Cuantificación de fenoles y flavonoides de los extractos metanólico y clorofórmico.

	Metanólico	Clorofórmico
Fenoles (mg(e AG)/g)	620.00	20.00
Flavonoides (mg(e Q)/g)	10.63	4.88

e AG = Equivalentes de Ácido Gálico por gramo de extracto; e Q =Equivalentes de Quercetina por gramo de extracto.

- Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

Los extractos metanólico y clorofórmico fueron sometidos a una cromatografía líquida de alta resolución, a continuación se presentan los cromatogramas correspondientes (Figura 5 a 9) y los grupos identificados (Cuadro 10 a 14).

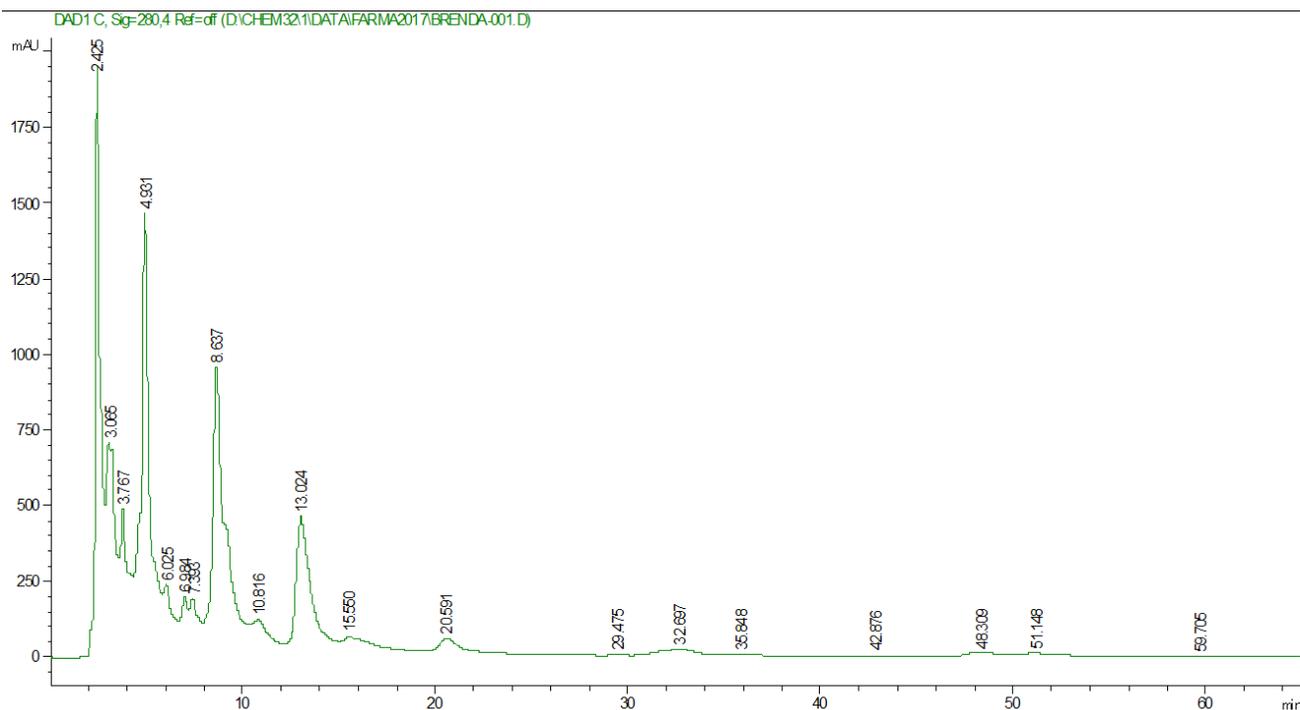
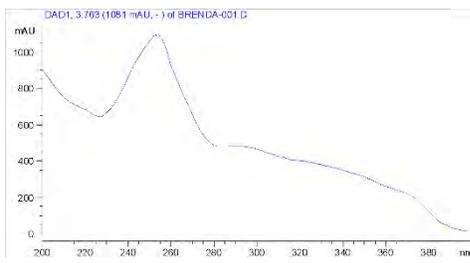
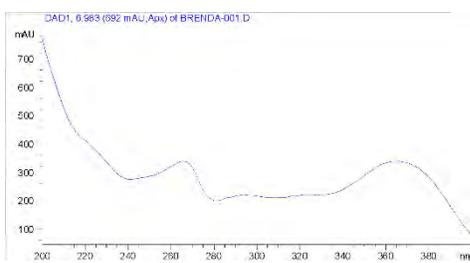
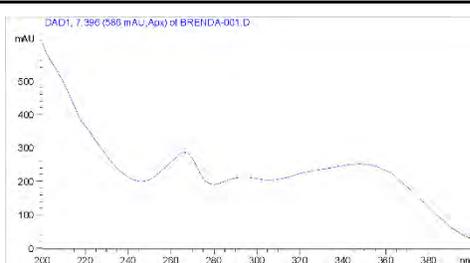
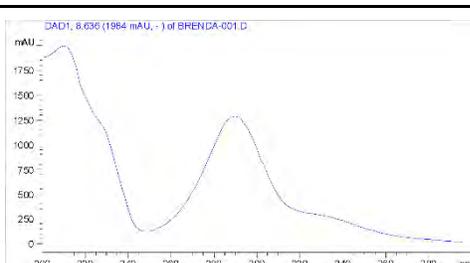
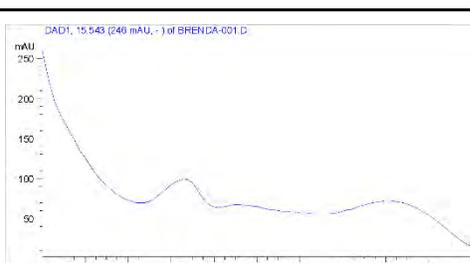


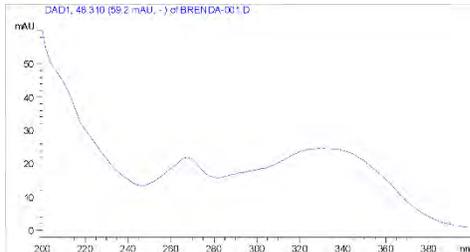
Figura 5. Cromatograma de la cromatografía líquida de alta resolución del extracto metanólico de propóleo a 280 nm.

En el cuadro 10 se presentan los compuestos identificados mediante el HPLC, aquellos que no coincidieron con la base de datos se determinaron a un nivel de grupo, de acuerdo a los espectros UV de Harborne, 1994.

Se puede observar el contenido de compuestos de origen fenólico en el extracto metanólico de propóleo.

Cuadro 10. Compuestos detectados en la cromatografía líquida de alta resolución del extracto metanólico a 280 nm.

No.	Tiempo de Retención (min)	λ máx (nm)	Compuesto	Espectro
1	3.767	254	Ácidos fenólicos	
2	7.393	266, 294, 366	Camferol	
3	8.637	208, 268, 294, 348	Hidroxicumarina	
4	13.024	210, 230, 290, 332	Pinocembrina	
5	29.475	268, 292, 364	Flavonol	

6	48.309	210, 268, 324	Acetina	
---	--------	---------------	---------	---

En la figura 6 se presenta el cromatograma de la prueba de HPLC a 254 nm para el extracto metanólico y al no existir coincidencias con la base de datos fue posible identificar a un nivel de grupo un compuesto de origen fenólico (Cuadro 11).

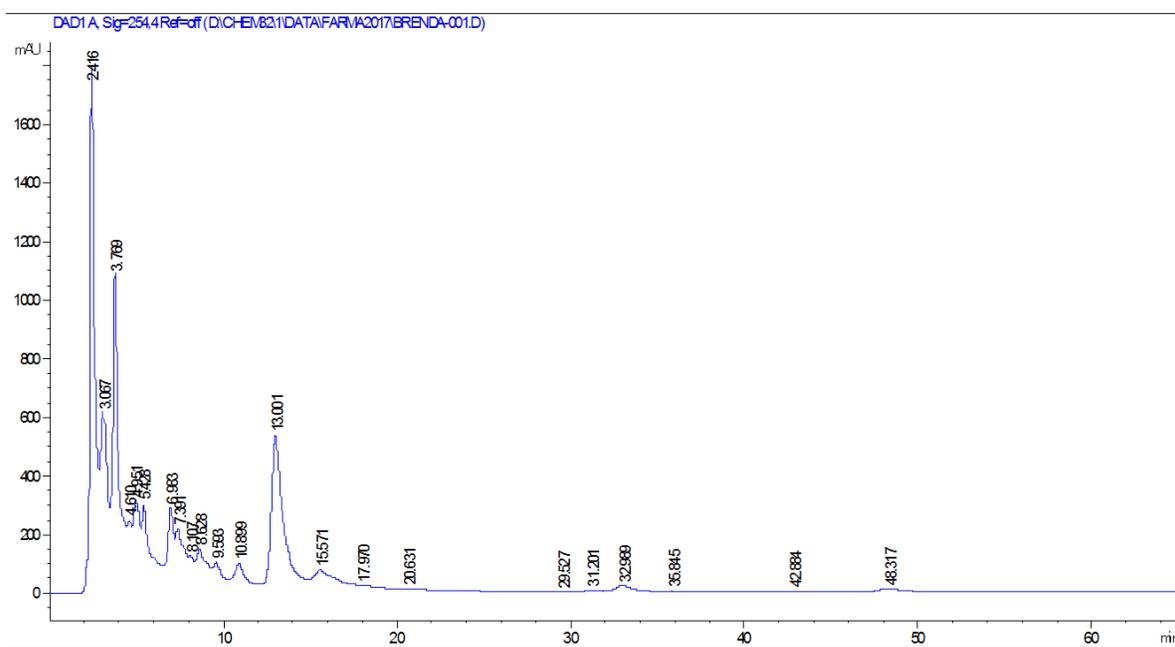
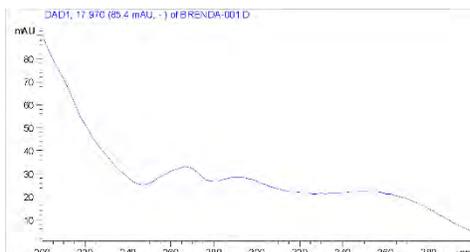


Figura 6. Cromatograma de la cromatografía líquida de alta resolución del extracto metanólico de propóleo a 254 nm.

Cuadro 11. Compuestos detectados en la cromatografía líquida de alta resolución del extracto metanólico a 254 nm.

No.	Tiempo de Retención (min)	λ máx (nm)	Compuesto	Espectro
1	4.61	266, 290, 258	Flavonol	

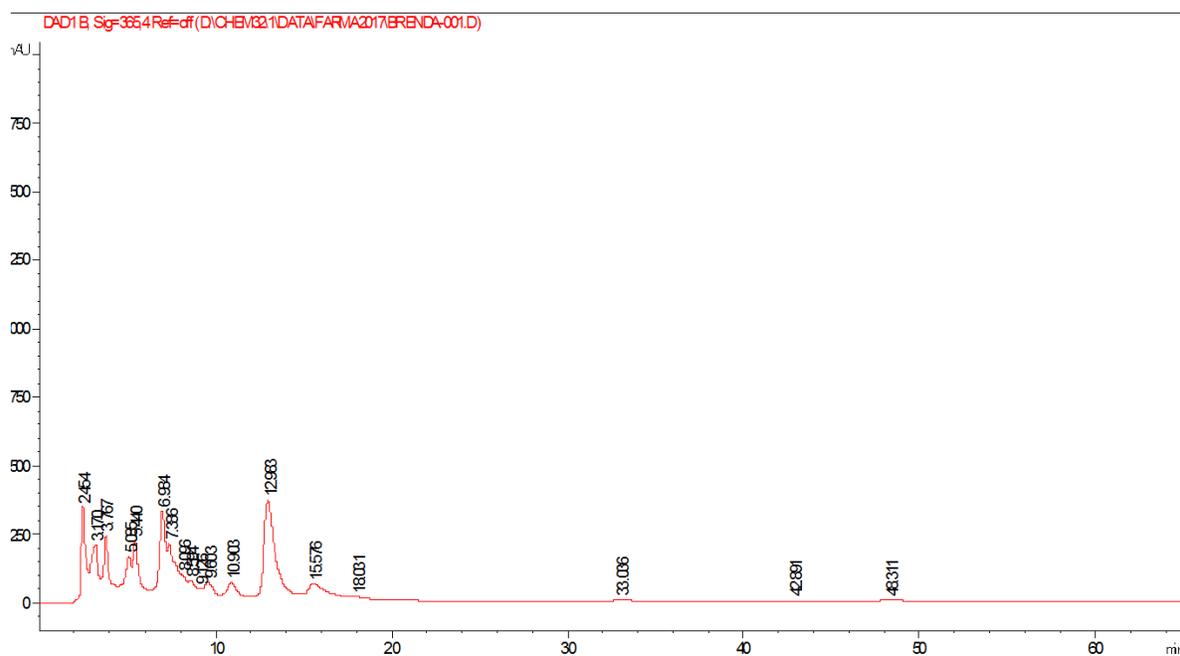


Figura 7. Cromatograma de la cromatografía líquida de alta resolución del extracto metanólico de propóleo a 365 nm

Cuadro 12. Compuestos detectados en la cromatografía líquida de alta resolución del extracto metanólico a 365 nm.

No.	Tiempo de Retención (min)	λ máx (nm)	Compuesto	Espectro
1	5.44	210, 228, 292, 334	Pinocembrina	
2	7.386	266, 292, 362	Flavonol	

El cromatograma de la figura 8 corresponde al extracto clorofórmico a 280 nm. Igualmente aquellos picos que no tuvieron coincidencia con la base de datos fueron determinados a un nivel de grupo mediante Harborne, 1994. Los cuales corresponden a compuestos de origen fenólico (Cuadro 13).

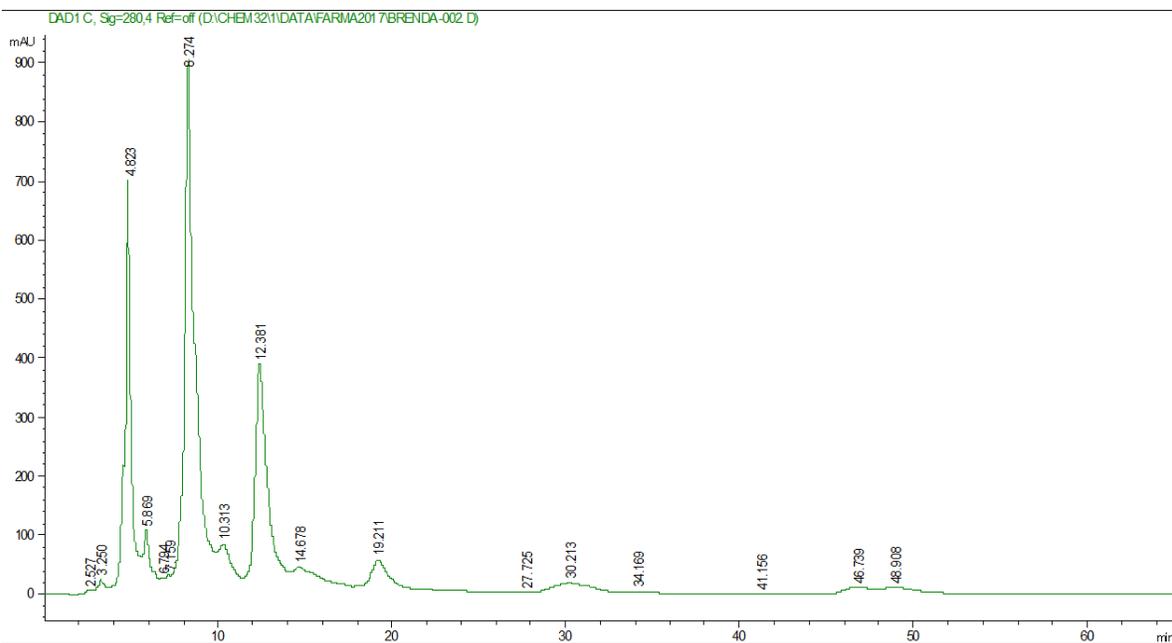
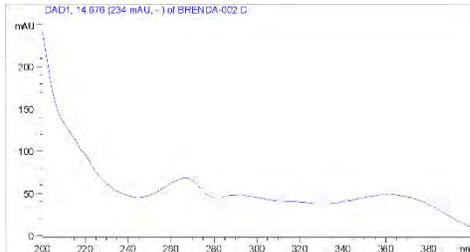
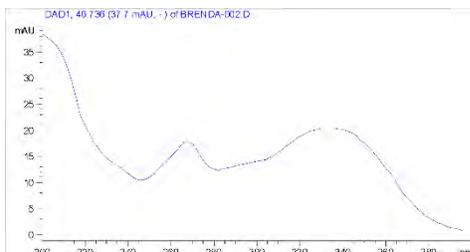


Figura 8. Cromatograma de la cromatografía líquida de alta resolución del extracto clorofórmico de propóleo a 280 nm.

Cuadro 13. Compuestos detectados en la cromatografía líquida de alta resolución del extracto clorofórmico a 280 nm.

No.	Tiempo de Retención (min)	λ máx (nm)	Compuesto	Espectro
1	5.869	270, 290, 358	Flavonol	
2	7.159	210, 228, 290, 330	Pinocembrina	

3	12.381	266, 290, 362	Flavonol	
4	41.156	269, 336	Acacetina	

A continuación se presenta el cromatograma del extracto clorofórmico a 365 nm en la figura 9 y en el cuadro 14, una tabla con los compuestos identificados, los cuales resultaron ser de origen fenólico.

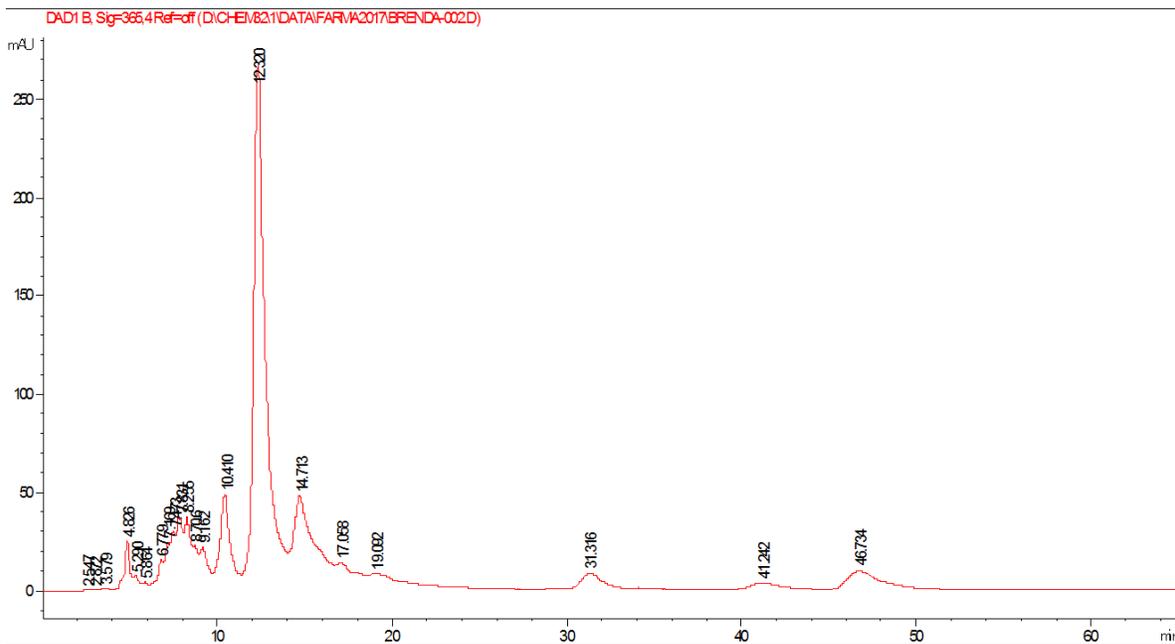
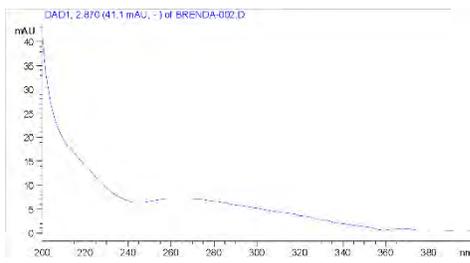
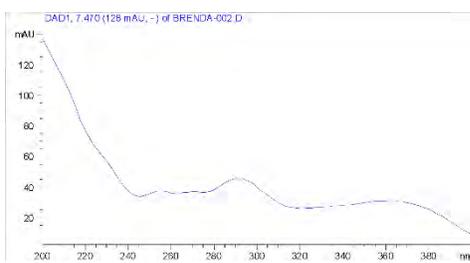
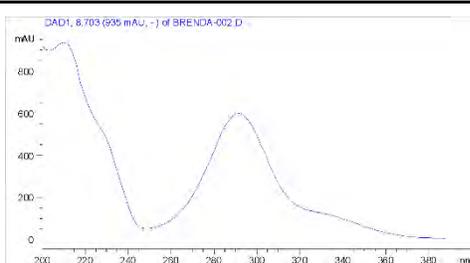
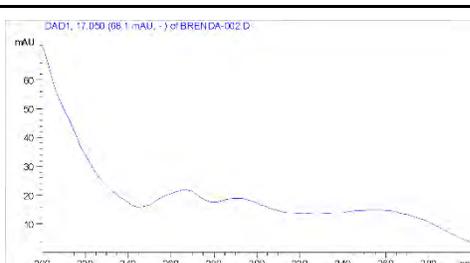


Figura 9. Cromatograma de la cromatografía líquida de alta resolución del extracto clorofórmico de propóleo a 365 nm.

Cuadro 14. Compuestos detectados en la cromatografía líquida de alta resolución del extracto clorofórmico a 365 nm.

No.	Tiempo de Retención (min)	λ máx (nm)	Compuesto	Espectro
1	2.547	266	Fenoles simples	
2	3.579	256, 292, 364	Flavonol	
3	5.29	210, 228, 292, 334	Pinocembrina	
4	6.779	266, 292, 358	Flavonol	

- Cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplada a Espectrometría de Masas (HPLC-MS)

Los resultados del análisis de los tres extractos de HPLC-MS, se muestran en los cromatogramas correspondientes al extracto metanólico (figura 10), clorofórmico (figura 11) y hexánico (figura 12); los compuestos, tiempo de retención y abundancia (cuadros 15 a 17).

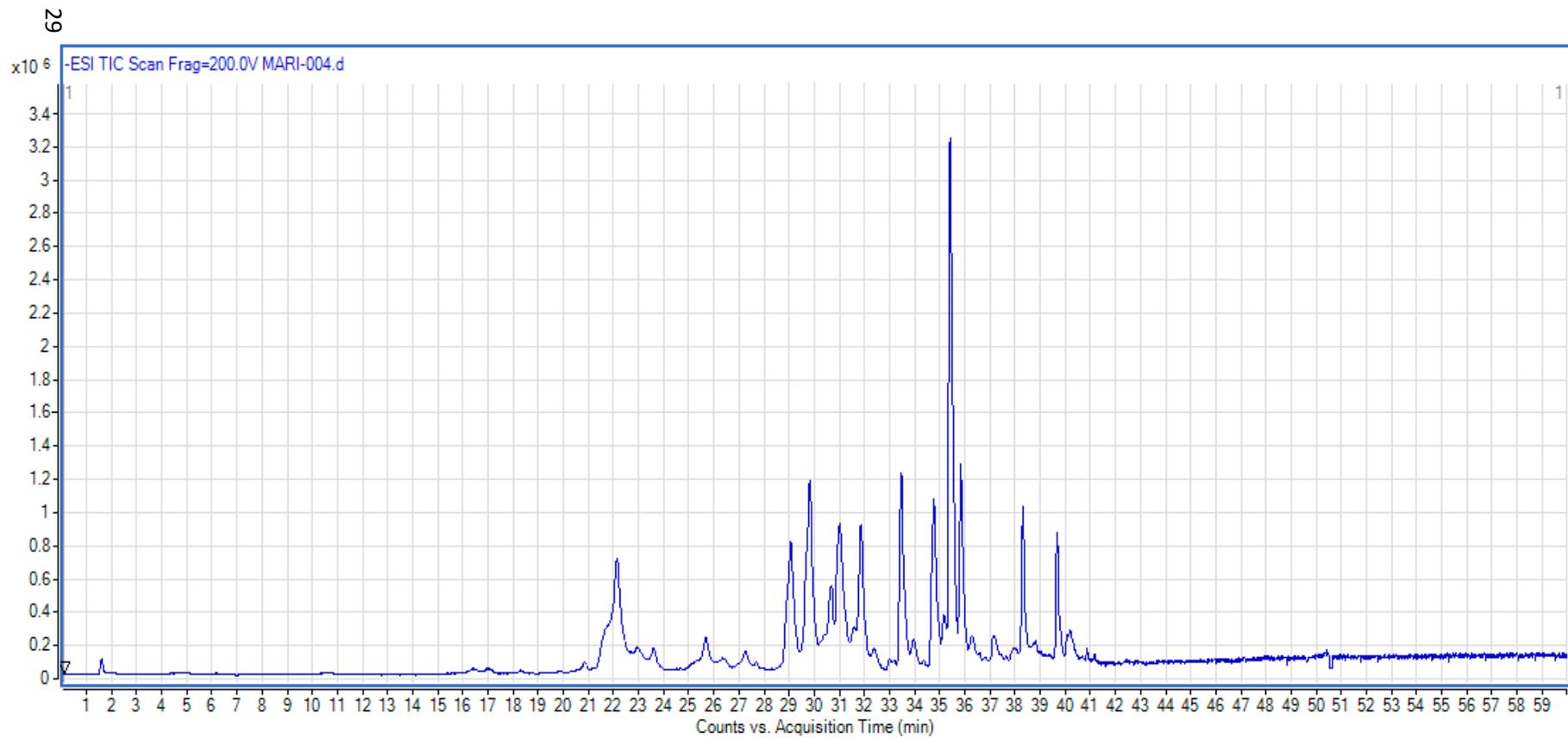


Figura 10. Cromatograma de la Cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplada a Espectrometría de Masas del extracto metanólico de propóleo.

En el cuadro 15 se pueden observar los compuestos identificados por el HPLC-MS a partir de su base de datos del extracto metanólico de propóleo, los cuales resultan ser flavonoides con diversas actividades biológicas.

Cuadro 15. Compuestos presentes en el extracto metanólico de propóleo, detectados en el HPLC-MS.

lón (m/z)	Tiempo de Retención (min)	Abundancia	Compuesto	Actividad
253.0621	29.817	14110644.7	Crisina	Antibacterial (Estrada-Reyes <i>et al.</i> , 2012), ansiolítico (Hernández, 2015), antigúngico (Shimura <i>et al.</i> , 2007)
255.0781	29.07	11481693.7	Pinocembrina	Antimicrobiano, antiinflamatorio, antioxidante, y anticancerígeno (Rasul <i>et al.</i> , 2013)
271.0729	22.086	16000664.7	Naringenina	Antioxidante, antihipertensivo (Orrego, 2016), antimicrobiano (Orhan, <i>et al.</i> , 2010).
283.0626	31.542	217986.7	Acacetina	Antiviral (Hayashi <i>et al.</i> , 1993)

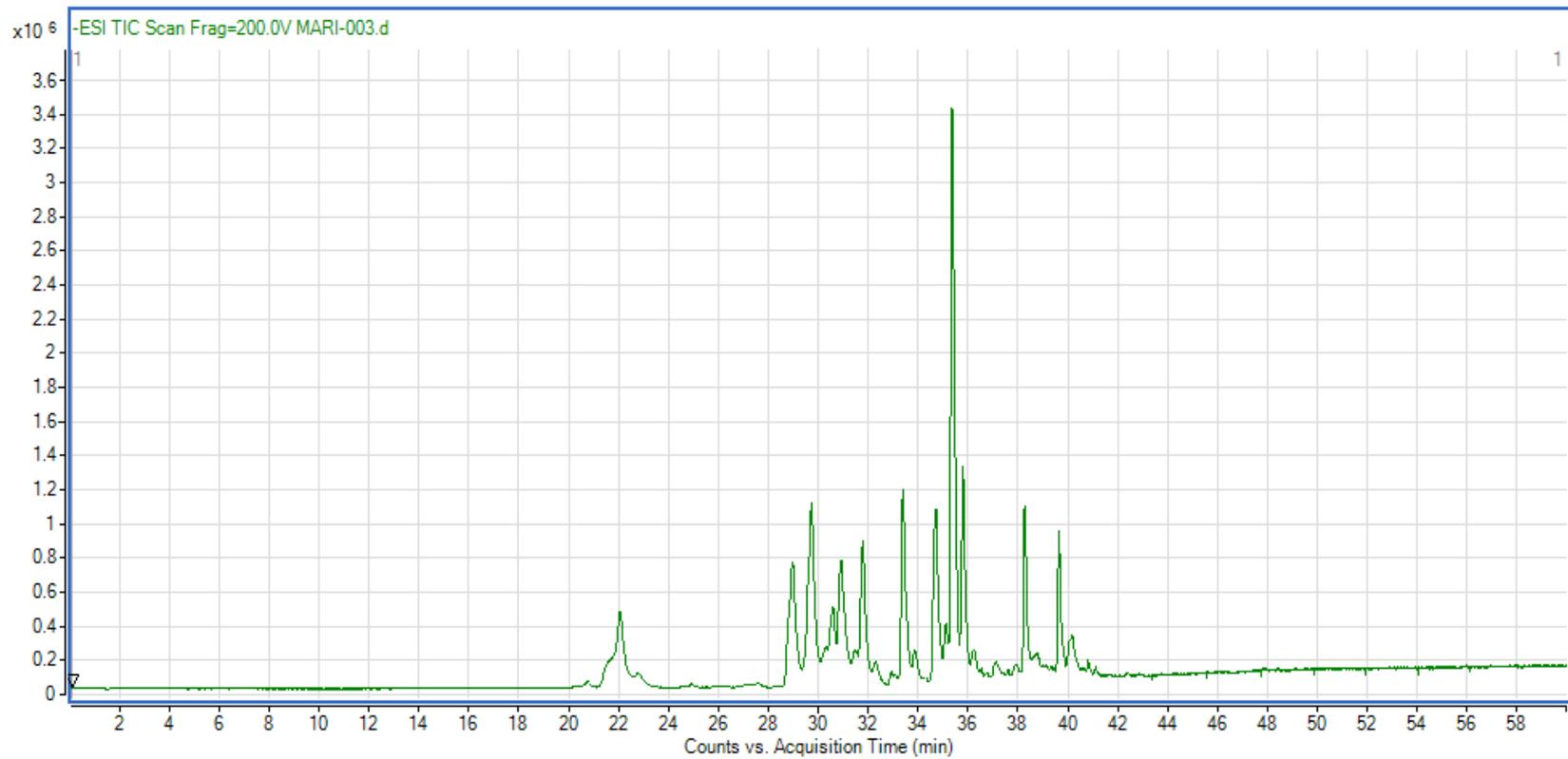


Figura 11. Cromatograma de la Cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplada a Espectrometría de Masas del extracto clorofórmico de propóleo.

En el cuadro 16 se encuentran los grupos identificados del extracto clorofórmico del propóleo con el HPLC-MS mediante la base de datos. Al igual que en el extracto metanólico, son flavonoides con actividades biológicas comprobadas.

Cuadro 16. Compuestos presentes en el extracto clorofórmico de propóleo, detectados en el HPLC-MS.

Ión (m/z)	Tiempo de Retención (min)	Abundancia	Compuesto
253.0611	29.732	13863023	Crisina
255.0769	28.969	11092383	Pinocembrina
271.0721	22.018	10204439	Naringenina
283.0717	31.458	213987.19	Acacetina

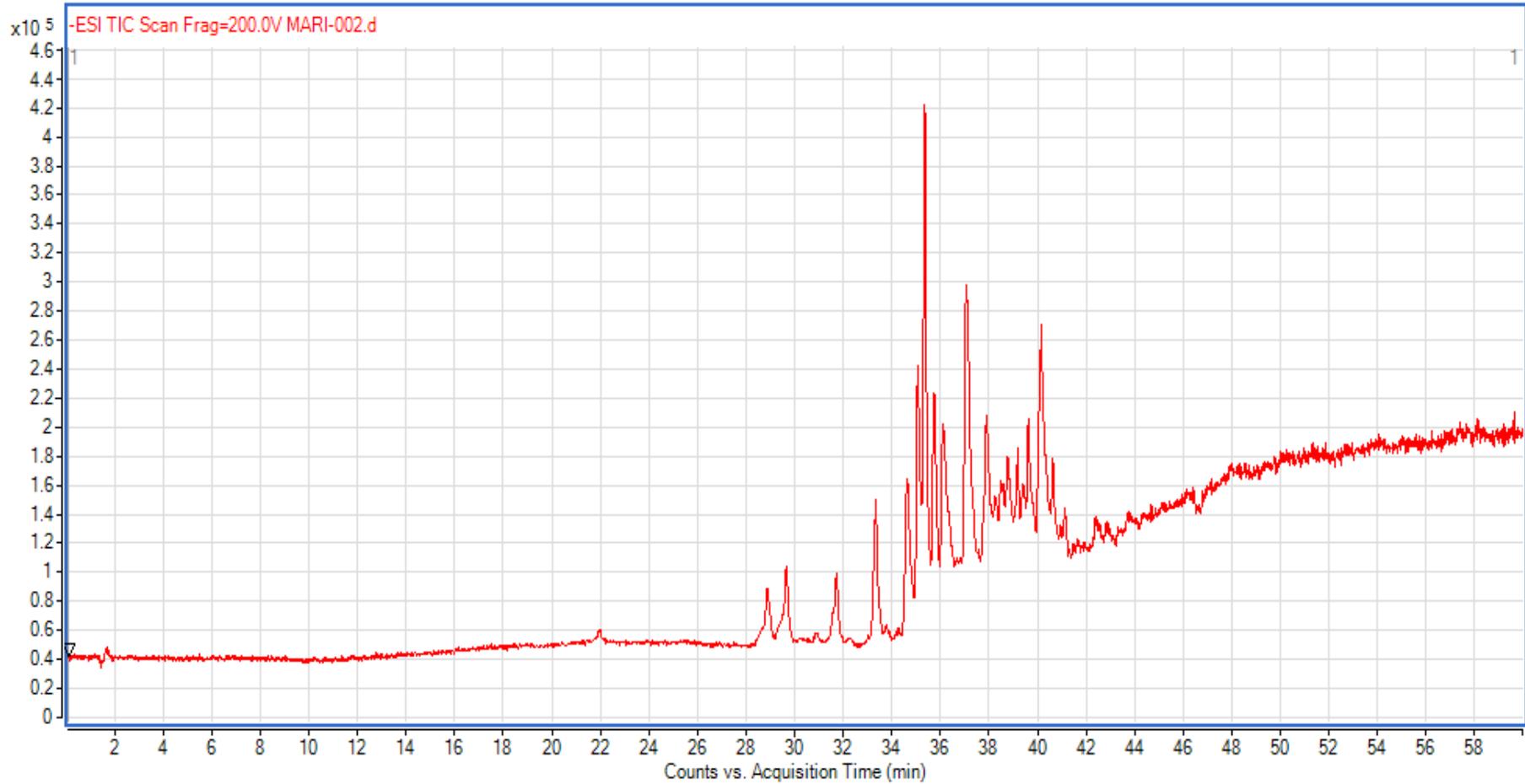


Figura 12. Cromatograma de la Cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplada a Espectrometría de Masas del extracto hexánico de propóleo.

Finalmente en el cuadro 17 se observan los compuestos identificados por el HPLC-MS del extracto hexánico de propóleo, los cuales también fueron reportados para los extractos metanólico y clorofórmico, pero se encuentran en menor abundancia.

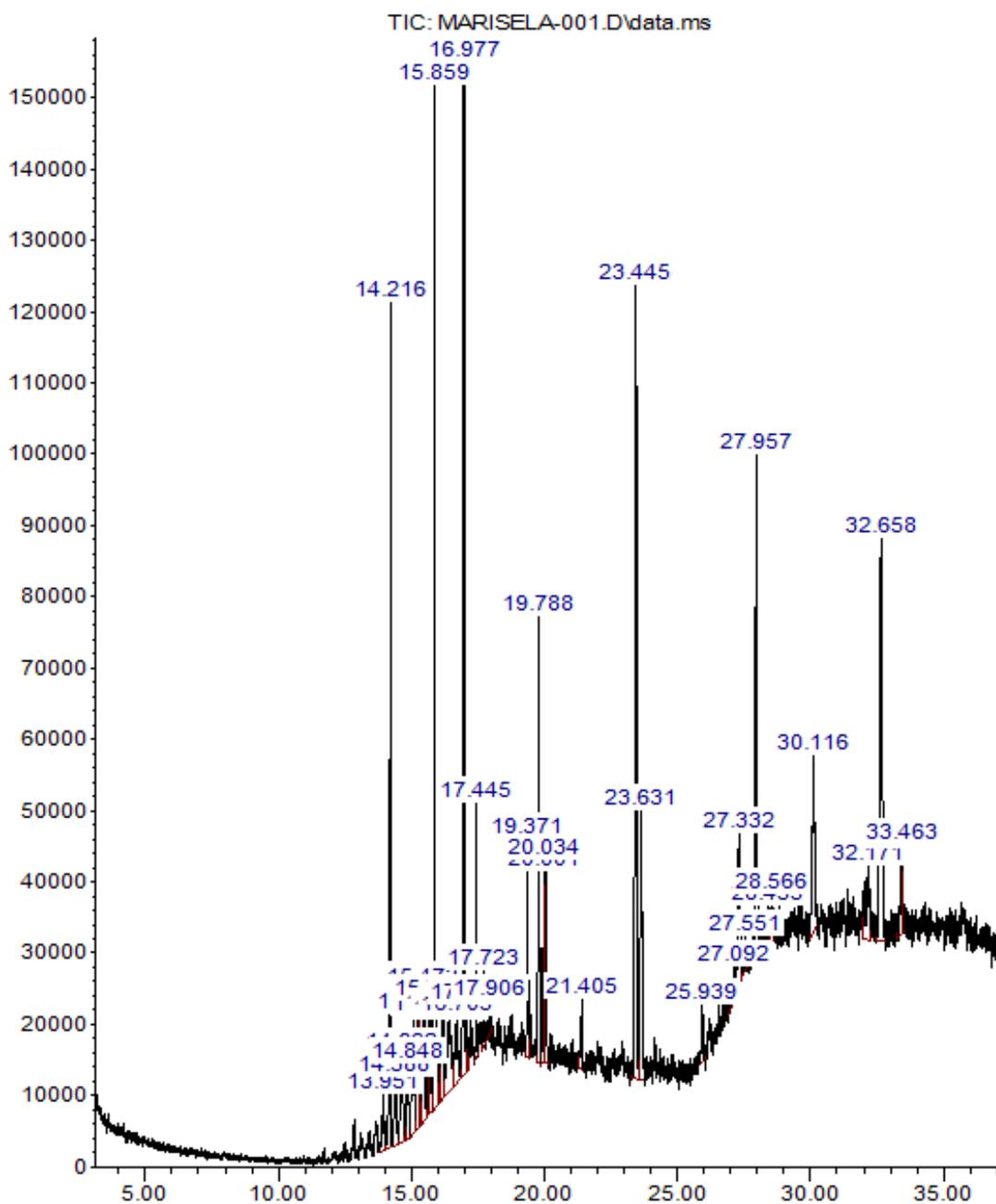
Cuadro 17. Compuestos presentes en el extracto hexánico de propóleo, detectados en el HPLC-MS.

Ión (m/z)	Tiempo de Retención (min)	Abundancia	Compuesto
253.0595	29.649	697196.92	Crisina
255.0753	28.886	543344.09	Pinocembrina
271.0692	21.884	178210.5	Naringenina

- Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS).

El extracto hexánico de propóleo fue analizado por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas, el cromatograma se muestra en la figura 13.

Abundance



Time-->

Figura 13. Cromatograma de la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas del extracto hexánico de propóleo.

Después del análisis del extracto hexánico en GC-MS se identificaron los compuestos principales plasmados en el cuadro 18; los cuales son hidrocarburos

lineales que tienen antecedentes de actividades biológicas; mencionadas igualmente en el cuadro.

Cuadro 18. Compuestos detectados por GC-MS del extracto hexánico de propóleo.

Pico	Tiempo de Retención (min)	Área %	Compuesto	Estructura	Actividad
2	14.217	5.80	Hexacosano		Antibacteriana (Rukaiyat <i>et al.</i> , 2015), antifúngica (Kether <i>et al.</i> , 2012; Chuang <i>et al.</i> , 2007), antioxidante (Marrufo <i>et al.</i> , 2013)
16	16.976	8.70	Eicosano		Antibacteriana, antioxidante (Xu <i>et al.</i> , 2016), antifúngica, citotóxica (Hsouna <i>et al.</i> , 2011)
26	23.443	10.69	Heptacosano		Antifúngica (Kether <i>et al.</i> , 2012; Chuang <i>et al.</i> , 2007), antibacteriana, antioxidante (Marrufo <i>et al.</i> , 2013)

DISCUSIÓN

A pesar de que mundialmente han incrementado los casos de micosis invasivas; término referido a las infecciones causadas por hongos levaduriformes, filamentosos o dimórficos, que pueden diseminarse por vía sanguínea afectando diversos órganos hasta convertirse en padecimientos graves e incluso mortales, causadas por hongos oportunistas como *Candida* spp., *Cryptococcus* spp. y *Aspergillus* spp., por mencionar algunos ejemplos, no hay datos precisos de su prevalencia global y particularmente en México no existen registros sobre su incidencia, ya que no se consideran dentro de las prioridades nacionales de salud (Méndez-Tovar *et al.*, 2016). Aunado a esto, se encuentra la problemática en la administración incorrecta de medicamentos fungistáticos que al prolongar el tratamiento permiten la selección de clones resistentes. Una posible alternativa se basa en el descubrimiento de nuevos antifúngicos debido a la investigación de diferentes fuentes de compuestos bioactivos (Alzate *et al.*, 2009).

Se cuenta con diversas investigaciones referentes a extractos de propóleos mexicanos (Martínez, 2013; Gutiérrez, 2011; Londoño *et al.*, 2008); en los últimos 50 años se han revelado diversas actividades biológicas asociadas a ellos, efecto antibacteriano, antimicótico, antiviral, citotóxico, antioxidante, antiinflamatorio, inmunomodulador entre otros (Bankova *et al.*, 2014). Además de comprobar sus propiedades, establecen que éstas dependen de su composición química, asociada con la región geográfica, temporada, vegetación y el solvente de extracción (Quintero-Mora *et al.*, 2008). Sin embargo no hay antecedentes donde se comparen extractos de un mismo propóleo obtenidos con solventes distintos.

Tras la experimentación con los extractos metanólico, clorofórmico y hexánico, las pruebas cualitativas sobre levaduras muestran que éstas son sensibles al extracto metanólico (Cuadro 4), donde los mayores halos de inhibición se presentaron en los casos clínicos de *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. glabrata* (6.67, 7.0 y 6.67 mm respectivamente), lo que coincide con estudios previos sobre el género, donde concluyen que extractos etanólicos de propóleo presenta actividad inhibitoria sobre cepas de *Candida* (Cabrera, 2017; Martínez, 2008). Previamente se ha atribuido esta propiedad a los compuestos polares, fenoles (Ota *et al.*, 2001), como los flavonoides, principalmente a ácido benzoico, sacranetina, galangina y/o pinocembrina, compuestos con actividad antimicrobiana comprobada (Gil *et al.*, 2015; Cabrera, 2017), de manera particular, la pinocembrina fue uno de los componentes químicos identificados tras la Cromatografía Líquida de Alta Resolución con Detector de Arreglo de Diodos y en la Cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplada a Espectrometría de Masas (Figura 5).

Con los extractos hexánico y clorofórmico no se obtuvieron halos de inhibición (Cuadro 4, figura 1), probablemente ocasionado por los compuestos aislados y la concentración de éstos; ya que ambos extractos se obtuvieron con solventes de menor polaridad a la del metanol, por lo que disuelven compuestos como ceras y lípidos, mientras que el metanol es un solvente polar que permite extraer compuestos como los diversos compuestos fenólicos (Beltrán *et al.*, 2013).

Respecto a los hongos filamentosos, se observó deformación en los crecimientos miceliales con los 3 extractos (Cuadro 5), principalmente en *Trichophyton mentagrophytes* CDBB-H-1112 (Figura 2), Koç y Silici (2008), introducen al propóleo como una sustancia con capacidad antifúngica efectiva después de evaluarlo sobre *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes*, atribuyendo esta actividad a la presencia de compuestos fenólicos. Del mismo modo Gavanji *et al.* (2011), concluyen que el extracto etanólico del propóleo puede usarse contra hongos dermatofitos, después de probarlo sobre cepas de *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton violaceum* y *Trichophyton tonsurans*, además que los extractos más comunes empleados en métodos biológicos son el etanólico, metanólico y acuoso, como lo emplean de manera tradicional (Martínez, 2008; Gutiérrez, 2011).

Debido a la actividad del extracto metanólico sobre levaduras las CF₅₀ calculadas en 9 de las 15 cepas examinadas fue igual o menor a 2.5 mg/mL, en las 6 cepas restantes la CF₅₀ resultó entre 2.5 y 15 mg/mL (Cuadro 6). De manera particular, los antecedentes reportan concentraciones mínimas inhibitorias de 0.6 mg/mL a >10 mg/mL para *Candida albicans* ATCC 10231 (Quintero-Mora *et al.*, 2008), el extracto metanólico de un propóleo de Michoacán obtuvo una CFM de 15.0 mg/mL.

Los estudios previos mencionan el uso del propóleo para la prevención y tratamiento de la candidiasis oral o vaginal, incluso, que el extracto etanólico puede usarse como alternativa en el tratamiento de candidiasis en pacientes VIH positivos (Martínez, 2008). Son diversos los estudios que mencionan al propóleo con actividad antifúngica, principalmente contra cepas del género *Candida*; sin embargo con la obtención de la CFM para hongos filamentosos también se muestra el efecto del propóleo ante estos organismos, ya que en los extractos metanólico y clorofórmico la CFM resultó de 1.25 mg/mL y 5 mg/mL para el extracto hexánico (Cuadro 7).

Para observar el efecto del extracto metanólico en el crecimiento de los hongos levaduriformes se llevó a cabo una cinética de crecimiento con 2 cepas de *C. albicans*, un caso clínico y ATCC 10231. Para cada cepa se emplearon 3 concentraciones (CFM= 2.5 mg/mL, CF₅₀ = 1.25 mg/mL y ½ CF₅₀ = 0.625 mg/mL), además de un grupo testigo para comparar los crecimientos por 48 horas. En el caso clínico se obtuvo un efecto fungicida, a partir de las primeras 5 horas es posible

observar el descenso de las UFC en las diferentes concentraciones mientras que el grupo testigo continúa con un crecimiento normal (Figura 3). Con la concentración de extracto más alta (CFM= 2.5 mg/mL) se observó la inhibición total del crecimiento colonial a partir de las 8 horas, situación que se conservó hasta las 32 horas, donde se observa nuevamente crecimiento, el cual decae a cero al finalizar las 48 horas. Un comportamiento similar se observó en las otras dos concentraciones; con CF₅₀ se alcanzó la inhibición total a las 12 horas, a las 24 horas se presentó de nuevo crecimiento, sin embargo desde las 32 horas dejaron de presentarse colonias. Respecto a ½ CF₅₀ no se inhibió totalmente a la cepa, pero al comparar con el grupo testigo se observa una disminución del crecimiento a partir de las 12 horas, presentó crecimiento hasta las 24 horas, y posteriormente comenzó a disminuir, continuando de esta forma hasta el final del experimento. Este comportamiento en la cepa de caso clínico de *C. albicans* puede explicarse debido a un fenómeno denominado trailing growth, el cual se emplea para describir un crecimiento reducido en cepas de *Candida albicans* y *C. tropicalis* sometidas a compuestos biológicamente activos. Haciendo parecer que un aislamiento susceptible a las 24 horas, es resistente posterior a este tiempo (Lee *et al.*, 2004). Mai *et al.*, en 2007, describen que de manera *in vitro* los azoles no matan al organismo, sino que en algunos casos clínicos, no logran suprimir el crecimiento, resultando en un crecimiento posterior en los ensayos. Se demostró que esta resistencia adquirida es inducible y rápida pero transitoria, se piensa que implica mutaciones y reordenamientos genéticos.

En la cinética de crecimiento de *C. albicans* ATCC 10231 se emplearon las mismas concentraciones que en el caso clínico, con ninguna de las 3 concentraciones del extracto se obtuvieron cero UFC, sin embargo se mantuvieron por debajo del grupo testigo, con la concentración de CFM se alcanzó la menor disminución de UFC (Figura 4). Martínez en 2008, determinó que el propóleo desorganiza el citoplasma, la membrana citoplasmática y la pared celular de *C. albicans*, lo que puede provocar la inhibición de la síntesis de proteínas o la destrucción de la célula.

Cuando se presenta una infección el organismo pasa por diversas reacciones donde se generan radicales libres, los cuales permiten inhibir el crecimiento de los microorganismos invasores (Hernández, 2010). Sin embargo, el organismo puede sufrir ciertos desequilibrios que conducen al ataque de los radicales libres hacia lípidos de las membranas celulares, modificando proteínas estructurales, así como carbohidratos y ADN (Vargas-Sánchez *et al.*, 2014), lo cual se vuelve de gran importancia al tratarse de infecciones causadas por microorganismos oportunistas como los hongos filamentosos y levaduras, por lo que otra propiedad analizada de los extractos fue su capacidad antioxidante, el extracto metanólico presentó una capacidad antioxidante media de 13.3 µg/mL y el clorofórmico de 1195.4 µg/mL, como control positivo se empleó quercetina (CA₅₀= 6.55 µg/mL) (Cuadro 8). De

acuerdo al índice de actividad antioxidante (Scherer y Teixeira, 2009) el extracto metanólico presenta una capacidad antioxidante muy fuerte, ya que se necesita menor cantidad de este para reducir el DPPH, mientras que el extracto clorofórmico tiene una capacidad antioxidante pobre. Esta capacidad se debe a su contenido de polifenoles como ácidos fenólicos y flavonoides (Zabaiou *et al.*, 2017).

Como se ha mencionado, diversos autores justifican las propiedades biológicas del propóleo debido a su contenido de compuestos fenólicos y esto se ve reflejado en las diferencias presentes entre los 3 extractos. Por lo que se procedió a realizar la cuantificación de fenoles y flavonoides. Tras realizar una prueba cualitativa a los 3 extractos, la cual resultó negativa para el extracto hexánico, se continuó con la prueba cuantitativa. En la cuantificación de fenoles el extracto metanólico presentó mayor cantidad de fenoles (620 mg(e AG)/g) que el extracto clorofórmico (20 mg(e AG)/g). De la misma forma en el caso de flavonoides, donde el extracto metanólico obtuvo 10.63 mg(e Q)/g y el clorofórmico 4.88 mg(e Q)/g (Cuadro 9), por lo que el solvente empleado para la extracción influirá en el contenido de fenoles y flavonoides y por lo tanto en su capacidad biológica. Beltrán *et al.*, 2013, determinaron el contenido de fenoles totales en 5 extractos de cuerpos fructíferos de *Pleurotus* sp. obtenidos con solventes de diferente polaridad: hexano, acetato de etilo, acetona, etanol y agua, concluyendo que el agua y el etanol son solventes polares en los que son solubles diferentes solutos polares como proteínas, carbohidratos y sales minerales. Por otra parte, solventes no polares como el hexano sólo disuelven compuestos apolares, como resinas, ceras y aceites.

A causa de su notable variabilidad los extractos metanólico y clorofórmico fueron analizados por cromatografía líquida de alta resolución, con el fin de obtener un perfil químico que permita una comparación. Con respecto al extracto metanólico fue posible identificar compuestos exactos como la pinocembrina, acacetina y el camferol, además de grupos como los ácidos fenólicos y los flavonoles a una longitud de onda de 280 nm (Cuadro 10). Koç y Silici (2008), justifica la actividad antibacteriana y antifúngica del propóleo debido a la presencia de diversos compuestos, principalmente fenoles (flavonoides, ácidos fenólicos y sus ésteres). De manera particular la pinocembrina, un compuesto flavonoide, ha demostrado una variedad de propiedades farmacológicas, como actividad antibacteriana, antiinflamatoria y, entre otras, actividad antifúngica, por ejemplo inhibiendo el crecimiento de *Penicillium italicum* causando daño a su membrana celular (Rasul *et al.*, 2013). También el camferol fue un flavonoide identificado en el extracto metanólico, el cual tiene diversas propiedades farmacológicas, incluyendo antioxidantes, antiinflamatorias, antimicrobianas, anticancerígenas, analgésicos, etc. (Calderón-Montaña *et al.*, 2011)

En el extracto clorofórmico igualmente se identificó pinocembrina y acacetina con la longitud de onda de 280 nm (Cuadro 13), además de los grupos flavonoles y flavonas. En la longitud de onda de 365 nm (Cuadro 14) se identificó nuevamente pinocembrina, además de flavonoles y fenoles simples. El perfil químico obtenido tras el estudio en el HPLC, además de los resultados de las pruebas biológicas coinciden con las investigaciones previas, que mencionan que la actividad antioxidante y antimicrobiana del propóleo se atribuye principalmente a los flavonoides (Vargas-Sánchez *et al.*, 2013).

En el análisis de HPLC-MS, se obtuvo que para los extractos metanólico y clorofórmico los principales flavonoides detectados fueron crisina, pinocembrina, naringenina y acacetina, mientras que el hexánico presentó crisina, pinocembrina y naringenina (Cuadro 15, 16 y 17) los cuales se reportan como componentes característicos del propóleo (Huang *et al.*, 2014; Bankova *et al.*, 2002).

La pinocembrina es uno de los flavonoides que se presentan en mayor concentración en los propóleos (Lotti *et al.*, 2010), compuesto conocido por su variedad de actividades biológicas, como antibacteriano, antiinflamatorio, anticancerígeno, neuroprotector, etc. (Rasul *et al.*, 2013). La pinocembrina ha mostrado actividad antifúngica, inhibe el crecimiento micelial interfiriendo con la homeostasis energética y el daño de la membrana celular.

Los demás flavonoides detectados tras el análisis tienen reportes previos de su actividad biológica, a la crisina se le atribuyen propiedades antibacterianas y antifúngicas (Estrada-Reyes *et al.*, 2012; Shimura *et al.*, 2007), a la naringenina antimicrobiano (Orhan *et al.*, 2010) y antioxidante (Orrego, 2016), a la acacetina antivirales (Hayashi *et al.*, 1993).

Respecto a la GC-MS, se obtuvieron principalmente 3 hidrocarburos, hexacosano, eicosano y heptacosano (Cuadro 18); para los cuales se ha reportado actividad antibacteriana, antioxidante, antifúngica, entre otras (Rukaiyat *et al.*, 2015; Marrufo *et al.*, 2013; Kether *et al.*, 2012; Hsouna *et al.*, 2011; Chuang *et al.*, 2007). Lo que justifica el efecto inhibitorio de los hongos filamentosos frente al extracto hexánico.

La composición del propóleo depende del área geográfica de origen, debido a las diferencias climáticas y de vegetación (Banskota *et al.*, 2001), lo que ha permitido que diversos estudios demuestren la variedad de actividades biológicas que puede presentar, entre ellas la antifúngica (Bankova, 2014).

Con la finalización de este trabajo se puede dar importancia a que el solvente empleado para la extracción de un propóleo influye en los compuestos que presentará dicho extracto y con ello sus actividades biológicas.

CONCLUSIONES

- Existe sensibilidad de los hongos levaduriformes frente el extracto metanólico y de los hongos filamentosos a los extractos metanólico, clorofórmico y hexánico del propóleo de Michoacán.
- El extracto metanólico tuvo un efecto fungicida y fungistático, dependiendo de la cepa.
- El extracto metanólico presentó la mayor capacidad antioxidante.
- En los extractos se identificaron compuestos de origen fenólico, como los flavonoides crisina, pinocembrina, naringenina y acacetina.

REFERENCIAS

- Alzate, N.A., López, V.K., Marín, H.A., Murillo, A.W., 2009. Evaluación preliminar de la actividad fungicida de los aceites esenciales de eucalipto (*Eucalyptus tereticornis*, Myrtaceae) y cáscara de naranja (*Citrus sinensis*, Rutaceae) sobre algunos Hongos filamentosos. Rev Tumbaga. 4, 59-71.
- Amaya, R.L.M., Portillo, M.C.I., 2013. Determinación de fenoles, flavonoides y capacidad antioxidante en melaza, azúcar blanco y moreno en el ingenio Chaparrastique por el método de espectrofotometría ultravioleta-visible. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química y Farmacia, Universidad de el Salvador, El Salvador, 115.
- Bankova V., 2005. Chemical diversity of propolis and the problema of standarization. J Ethnopharmacol. 100, 114-117.
- Bankova, V., Popova M., Bogdanov, S., Sabatini, A.G., 2002. Chemical Composition of European Propolis: Expected and Unexpected Results. Z. Naturforsch. 57 c, 530-533.
- Bankova, V., Popova, M., Trusheva, B., 2014. Propolis volatile compounds: chemical diversity and biological activity: a review. Chem Gen J, 8:28.
- Banskota, A.H., Tezuka, Y., Kadota, S., 2001. Recent Progress in Pharmacological Research of Propolis. Phytother Res 15, 561–571.
- Bellón, L.S., Calzadilla, M.X.M., 2007. Efectividad del uso del propóleo en el tratamiento de la estomatitis aftosa. Rev Cubana Estomatol. 44(3).
- Beltrán, D.Y., Morris, Q.H.J., Cruz, E.R., Quevedo, M.Y., Bermúdez, S.R.C., 2013. Contenido de fenoles totales en extractos de *Pleurotus* obtenidos con solventes de diferente polaridad. Rev Cubana Inv Biomed. 32, 121-129.
- Bonifaz, A., 2012. Micología médica básica. 4ta edición. Mc Graw Hill. México.
- Cabrera, R.G.C., 2017. Efectividad *in vitro* del propóleo sobre *Candida albicans*. Tesis de especialidad, Facultad de Posgrados, Perú, 73.

- Calderón-Montaño, J., Burgos-Morón, E., Pérez-Guerrero, C., López-Lázaro, M., 2011. A Review on the Dietary Flavonoid Kaempferol. *Mini Rev Med Chem.* 11, 298-344.
- Chuang, P-H., Lee, C-W., Chou, J-Y., Murugan, M., Shieh, B-J., Chen, H-M., 2007. Anti-fungal activity of crude extracts and essential oil of *Moringa oleifera* Lam. *Bioresour Technol.* 98, 232-236.
- CLSI., 2012. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for microbial susceptibility testing; twentieth informational supplement. Tech. Rep. M100-S22, Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Pennsylvania, USA. 184.
- Cuenca-Estrella, M., 2010. Antifúngicos en el tratamiento de las infecciones sistémicas: importancia del mecanismo de acción, espectro de actividad y resistencias. *Rev Esp Quimioter.* 23, 169-176.
- Cuevas, M.J.A., 2016. Los hongos: héroes y villanos de la prosperidad humana. *Revista Digital Universitaria.* 17(9). Disponible en Internet: <http://www.revista.unam.mx/vol.17/num9/art69/index.html>. Consultada el 26 de agosto de 2017.
- Davis, B.D., Dulbecco, R., 1996. Tratado de microbiología. 3ra edición. Salvat Editores. España. 285.
- Domínguez, X.A., 1973. Métodos de Investigación Fitoquímica (1ra edición). Limusa. México. 3-17.
- Estrada- Reyes, R., Ubaldo-Suárez, D., Araujo-Escalona, A.G., 2012. Los flavonoides y el Sistema Nervioso Central. *Salud Mental.* 35, 375-384.
- Farré, R., Frasquet, I., Sánchez, A., 2004. El própolis y la salud. *Ars Pharm.* 45, 21-43.
- Gavanji, S., Asgari, M.J., Vaezi, R., Larki, B., 2011. Antifungal effect of the extract of propolis on the growth of three species of *Epidermophyton flucosum*, *Trichophyton violaceum* and *Trichophyton tonsorans* in laboratory environment. *J Pharm Pharmacol.* 5, 2642-2646.
- Gil, F.M.M., Joya, M., González, L., Figueroa, Z., Perozo, E., 2015. Efecto Fungistático y Fungicida del extracto etanólico de propóleos sobre especies de *Candida*. VIII Congreso Nacional y 2do. Congreso Internacional de Investigación. Valencia.
- González, A., González, M.A., 1960. Micosis en México. *Salud Públ Méx.* 1, 103-115.
- Gutiérrez, H.E., 2011. Actividad antibacteriana y perfil químico de propóleos mexicanos sobre cepas de *Pasteurella multocida* aisladas de conejos. Tesis de Maestría, UNAM, México, 79.

- Guija-Poma, E., Inocente-Camones, M.A., Ponce-Pardo, J., Zarzosa-Norabuena, E., 2015. Evaluación de la técnica 2,2-Difenil-1-Picrilhidrazilo (DPPH) para determinar capacidad antioxidante. *Horiz Méd.* 15, 57-60.
- Harbone, J., 1994. *The flavonoids: Advances in Research since 1986*. 1ra edición. Ed Chapman and Hall. Inglaterra.
- Hayashi, K., Hayashi, T., Arisawa, M., Morita, N., 1993. Antiviral agents of plant origin. Antiherpetic activity of acacetin. *Antiv Chem Chemothe.* 4, 49-53.
- Hernández, H.A.B., 2010. Actividad antifúngica de *Jatropha neopauciflora* Pax. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, México, 59.
- Hernández, L.F., 2015. Participación del hipocampo dorsal en el efecto ansiolítico del flavonoide crisina: Interacción con el ciclo estral. Tesis de doctorado, Universidad Veracruzana, México. 97.
- Hernández, P.V. 2013. Implementación del método de Cromatografía Líquida de Alta Resolución para la identificación y cuantificación de flavonoides presentes en propóleos mexicanos. Tesis de Licenciatura, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, México, 77.
- Hsouna, A.B., Trigui, M., Mansour, R.B., Jarraya, R.M., Damak, M., Jaoua, S., 2011. Chemical composition, cytotoxicity effect and antimicrobial activity of *Ceratonia siliqua* essential oil with preservative effects against *Listeria* inoculated in minced beef meat. *Inter J Food Microbiol.* 48, 66-72.
- Huang, S., Zhang, C.P., Wang, K., Li, G.Q., Hu, F.L., 2014. Recent Advances in the Chemical Composition of Propolis. *Molecules.* 19, 19610-19632.
- INAFED Instituto para el Federalismo y el Desarrollo Municipal., 2010. Enciclopedia de los municipios y delegaciones de México. Michoacán de Ocampo. Consultada el 4 de Agosto de 2018 en: <http://www.inafed.gob.mx/work/enciclopedia/EMM16michoacan/index.html>
- INEGI Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática., 2005. Sistema para la Consulta del Cuaderno Estadístico Municipal de Zacapú, Michoacán de Ocampo. Consultada el 4 de Agosto de 2018 en: <http://www.inegi.org.mx//est/contenidos/espanol/sistemas/cem05/estatal/mic/m107/index.htm>
- INEGI Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática., 2009. Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos. Zacapú, Michoacán de Ocampo. Consultado el 4 de Agosto de 2018 en: http://www3.inegi.org.mx/contenidos/app/mexicocifras/datos_geograficos/16/16107.pdf

- Kether, F.B.H., Mahjoub, M.A., Mahjoub, S.A., Salah, K.B., Helal, A.N., Mighri, Z., 2012. Chemical composition, *in vitro* antifungal and antioxidant activities of essential oil from *Cotula coronopifolia* L. growing in Tunisia. *Afr J Microbiol Res.* 6, 4388-4395.
- Koç, N.A., Silici, S., 2008. Comparative study of *in vitro* methods used to analyse the antifungal activity of propolis against *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes*. *Ann Microbiol.* 58, 543-547.
- Kuropatnicki, A.K., Szliszka, E., Krol, W., 2013. Historical Aspects of Propolis Research in Modern Times. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013, Article ID: 964149.
- Lee, M.K., Williams, L.E., Warnock, D.W., Arthington-Skaggs, B.A., 2004. Drug resistance genes and trailing growth in *Candida albicans* isolates. *JAC.* 53, 217–224.
- León, U.G., Sacsquispe, C.S., Zurita, M.S., 2014. Efecto antifúngico *in vitro* sobre el crecimiento en *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida glabrata* ATCC 90030 y *Candida krusei* ATCC 6258 expuestas al propóleo de Oxapampa a las 24, 48 y 120 horas. *Rev Inv Uni Norbert Wiener.* 3, 23-29.
- Londoño, O.A., Penieres, C.J.G., García, T.C.G., Carrillo, M.L., Quintero M.M.L., García, V.S.E., Mendoza, S.M.A., Cruz, S.T.A., 2008. Estudio de la actividad antifúngica de un extracto de propóleo de la abeja *Apis mellifera* proveniente del estado de México. *Tecnología en marcha.* 21, 49-55.
- Lotti, C., Campo, F.M., Piccinelli, A.L., Cuesta-Rubio, O., Márquez, H.I., Rastrell, L., 2010. Chemical constituents of red Mexican propolis. *J Agric Food Chem.* 58, 2209–2213
- Mai, A., Rotili, D., Massa, S., Brosch, G., Simonetti, G., Passariello, C., Palamara, A.T., 2007. Discovery of uracil-based histone deacetylase inhibitors able to reduce acquired antifungal resistance and trailing growth in *Candida albicans*. *Bioorg. Med Chem Lett.* 17. 1221–1225.
- Marrufo, T., Nazzaro, F., Mancini, M., Fratianni, F., Coppola, R., De Martino, L., Agostinho, A.B., De Feo, V., 2013. Chemical Composition and Biological Activity of the Essential Oil from Leaves of *Moringa oleifera* Lam. Cultivated in Mozambique. *Molecules.* 18, 10989-11000.
- Martínez, R.M. 2013. Evaluación *in vitro* del efecto antimicótico del propóleo sobre *Trichophyton mentagrophytes*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, México, 60.
- Martínez, U.C., 2008. Efecto del extracto etanólico de propóleo sobre el crecimiento y daño estructural de *Candida albicans*. Tesis de licenciatura, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, México. 88.
- Méndez-Tovar, L.J., Mejía-Mercado, J.A., Manzano-Gayosso, P., Hernández-Hernández, F., López-Martínez, R., Silva-González, I., 2016.

- Frecuencia de micosis invasivas en un hospital mexicano de alta especialidad. Experiencia de 21 años. Rev Med IMSS. 54, 581-587.
- NORMA Oficial Mexicana NOM-003-SAG/GAN-2017, Propóleos, producción y especificaciones para su procesamiento. Diario Oficial de la Federación. No. 6. 6 octubre 2017. 27-35 pp.
 - Organización Mundial de la Salud (OMS), (2000). Pautas generales para las metodologías de investigación y evaluación de la medicina tradicional.
 - Okusa, P., Penge, O. Devleeschouwer, M., Duez, P., 2007. Direct and indirect antimicrobial effects and antioxidant activity of *Cordia gillettii* De Wild (Boraginaceae). J Ethnopharmacol. 112, 476-481.
 - Orhan, D.D., Ozçelik, B., Ozgen, S., Ergun, F., 2010. Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of some flavonoids. Microbiol Res. 165, 496-504
 - Orrego, L.N., 2016. Estudios de absorción y disposición de naringenina y quercetina. Estudios preclínicos. Tesis de doctorado, Universidad de Barcelona, España. 174.
 - Osuna, T.L., Tapia, P.M.E., Aguilar, C.A., 2005. Plantas medicinales de la medicina tradicional mexicana para tratar afecciones gastrointestinales. Estudio etnobotánico, fitoquímico y farmacológico. Universitat de Barcelona. Barcelona.
 - Ota, C., Unterkircher, C., Fantinato, V., Shimizu, M.T., 2001. Antifungal activity of propolis on different species of *Candida*. Mycoses. 44, 375-378.
 - Palomino, L.R., García, P.M.L., Gil, G.J.H., Rojano, B.A., Durango, R.D.L., 2009. Determinación del contenido de fenoles y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos recolectados en el departamento de Antioquía (Colombia). Vitae, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica. 16, 388-395.
 - Quintero-Mora, M.L., Londoño-Orozco, A., Hernández-Hernández, F., Manzano-Gayosso, P., López-Martínez, R., Soto-Zárate, C.I., Carrillo-Miranda, L., Penieres-Carrillo, G., García-Tovar, C.G., Cruz-Sánchez, T.A., 2008. Efecto de extractos de propóleos mexicanos de *Apis mellifera* sobre el crecimiento *in vitro* de *Candida albicans*. Rev Iberoam Micol. 25, 22-26.
 - Ramamoorthy, P., Bono, A., 2007. Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content of *Morinda citrifolia* fruit extracts from various extraction processes. JESTEC. 2, 70-80.
 - Rasul, A., Millimouno, F.M., Eltayb, W.A., Ali, M., Li, J., Li, X., 2013. Pinocembrin: A novel natural compound with versatile pharmacological and biological activities. BioMed Res Inter. 2013, 1-9.
 - Rivera, Y.C.R., 2010. Actividad antimicrobiana y toxicidad general de *Rosa centifolia* L. Tesis Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. 65.

- Rivera-Yañez, N., Rodríguez-Canales, M., Nieto-Yañez, O., Jiménez-Estrada, M., Ibarra-Barajas, M., Canales-Martínez, M.M., Rodríguez-Monroy, M.A., 2017. Hypoglycaemic and Antioxidant Effects of Propolis of Chihuahua in a Model of Experimental Diabetes. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2018(24):1-10 .
- Rukaiyat, M., Garba, S., Labaran, S., 2015. Antimicrobial activities of hexacosane isolated from *Sanseveria liberica* (Gerome and Labroy) plant. *Adv Med Plant Res.* 3, 120-125.
- Scherer, R., Teixeira, G.H., 2009. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chem.* 112, 654-658.
- Silva, R.V.A., 2016. Análisis químico de una recolecta de propóleo de Zacatecas, México. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM, México, 65.
- Shimura, H., Matsuura, M., Takada, N., Koda, Y., 2007. An antifungal compound involved in symbiotic germination of *Cypripedium macranthos* var. *rebunense* (Orchidaceae). *Phytochem.* 68,1442-1447.
- Singleton, V., Orthofer, R., Lamuela-Reventós, R., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Meth Enzymol.* 299, 152-178.
- Soto-García M., Rosales-Castro M., 2016. Efecto del solvente y de la relación masa/solvente, sobre la extracción de compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante de extractos de corteza de *Pinus durangensis* y *Quercus sideroxylla*.
- Thammana, M., 2016. A Review on High Performance Liquid Chromatography (HPLC). *J Pharm Anal.* 5, 22-28.
- Urribarren, B.T., Bazán, M.E., Castañón, O.L.R., 2017. Generalidades de Micología. Recuperado de: <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/micologia/generalidades.html>
- Vargas-Sánchez, R.D., Torrescano-Urrutia, G.R., Mendoza-Wilson, A.M., Vallejo-Galland, B., Acedo-Félix, E., Sánchez-Escalante, J.J., Peñalba-Garmendia, M.C., Sánchez-Escalante, A., 2013. Mecanismos involucrados en la actividad antioxidante y antibacteriana del propóleo. *Rev Cien Biol Sal.* 16, 32-37.
- Wang, H., Bun, T.N., 2002. Isolation of an antifungal thaumatin -like protein from kiwi fruits. *Phytochem.* 61, 1-6.
- Xu, C., Zhao, S., Li, M., Dai, Y., Tan, L., Liu, Y., 2016. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of essential oil from fluecured tobacco flower bud. *Biotechnol Biotechnol Equip.* 30, 1026-1030.

- Zabaïou, N., Fouache, A., Trousson, A., Baron, S., Zellagui, A., Lahouel, M., Lobaccaro, J.M.A., 2017. Biological properties of propolis extracts: something new from an ancient product. *Chem Phys Lipids*. 207, 214-222.

ANEXOS

Anexo 1. Área de colecta

El municipio de Zacapú está localizado al norte de Michoacán, en las coordenadas 19°49' de latitud norte y 101°47' de longitud oeste, a una altura de 1,990 msnm. El municipio representa el 0.79% de la superficie de Michoacán. Su distancia a la capital del Estado es de 80 km (INAFED, 2010).

Clima

Su clima se clasifica como templado subhúmedo con lluvias en verano, de humedad media a mayor. Tiene una precipitación pluvial anual de 1,068.9 milímetros y temperaturas que oscilan entre 7.6 y 24.7 grados centígrados (INEGI, 2005).

Hidrografía

Su hidrografía se constituye principalmente por el río Angulo, Laguna de Zacapu y Zarcita, manantiales y numerosos canales de riego (INAFED, 2010).

Vegetación

El 39.61% corresponde a agricultura, el 4.65% a zona urbana, 43.89% es bosque, 7.36% pastizal y el 3.66% a selva (INEGI, 2009). Algunas especies presentes son *Quercus magnoliifolia*, *Pinus montezumae*, *Ternstroemia princkei*, *Abies sp.* *Pinus leiophylla*, *Ipomoea sp.* *Cyrtocarpa procera*, *Montanoa tormentosa*, entre otras (INEGI, 2005).

Anexo 2. Cinética de crecimiento de levaduras (Rivera, 2010)

Se prepara un tubo por lo menos para cada una de las concentraciones a probar (de preferencia que sean las concentraciones correspondientes a CFM, CF₅₀ y CF₂₅), para el muestreo desde el tiempo cero y después a intervalos de seis horas hasta las 48 horas.

Se prepara y rotula un tubo sin extracto que sirve como control del desarrollo (testigo).

Se prepara el inóculo con aproximadamente 1×10^5 levaduras/mL en un tubo de ensayo con 10 ml de caldo Sabouraud (esta concentración fúngica se obtiene en un periodo de 48 horas de incubación)

Se inocula con ayuda de una micropipeta 100 μ L de la suspensión de levaduras en los tubos que contendrán los extractos. La concentración final es de aproximadamente de 1×10^5 levaduras/mL de caldo en cada tubo. Se incuba en una estufa sin presión de CO₂

Se muestrea cada seis los primeros dos tiempos, después cada a las 12 horas y finalmente hasta las 48 horas. La duración del experimento será de 48 a 72 horas.

Se grafica el logaritmo del número de sobrevivientes en el eje de las "Y" contra el tiempo de incubación del eje de las "X", para determinar el número de impactos necesarios para que se produzca la muerte de la levadura, se prolongará la zona lineal de la curva de supervivencia hasta su intersección con el eje de las ordenadas (Davis y Dulbecco, 1996).