



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

---

---

Evaluación de la actividad antifúngica  
del propóleo del Estado de Morelos  
contra diversas especies del género  
*Candida*

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**Licenciado en**

**Bioquímica Diagnóstica**

PRESENTA:

**Emmanuel Catalán Maya**

ASESOR: Dr. Tonatiuh Alejandro Cruz Sánchez

COASESOR: M. en C. Betsabé Rodríguez Pérez



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.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
**SECRETARÍA GENERAL**  
 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 de la actividad antifúngica del propóleo del Estado de Morelos contra diversas especies del género *Candida*

Que presenta el pasante: Emmanuel Catalán Maya  
 Con número de cuenta: 412019991 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica

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 06 de Agosto de 2019.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Tonatiuh Alejandro Cruz Sánchez	
VOCAL	QFB. Brígida del Carmen Camacho Enriquez	
SECRETARIO	Dra. Alma Lucila Nuñez del Arco	
1er. SUPLENTE	QFB. Leticia Cubillo Carrillo	
2do. SUPLENTE	QFB. Arianna Lezama Uc	

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

LNCF/jav

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”.

El presente trabajo se realizó en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campo 4, en las instalaciones del Laboratorio 6 de Bioprospección Microbiológica de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria (UIM) a cargo del Dr. Tonatiuh A. Cruz Sánchez.



**ASOCIACIÓN MEXICANA DE MICOLOGÍA MÉDICA A.C.**

**Estimado(a) Dra. Betsabe Rodríguez Pérez.**

En el marco del **X Congreso Nacional de Micología Médica** que se llevará a cabo del 10 al 12 de octubre del 2019 en Oaxtepec, Morelos, le informamos que su trabajo de investigación **"EVALUACIÓN DE LA ALTERACIÓN CELULAR PRODUCIDA POR UN PROPÓLEO DEL ESTADO DE MORELOS SOBRE DIVERSAS ESPECIES DEL GÉNERO CANDIDA"** ha sido aceptado para presentación en Cartel.

La sesión en donde se presentará su trabajo será el día **Jueves 10 de octubre a las 15:30 hrs.**

El número asignado para su cartel es el **10**. Por favor coloque su cartel el día indicado a las 8:00 de la mañana, en la mampara que corresponde al número de su cartel. El cartel deberá ser retirado después de su evaluación.

Es indispensable su presencia durante la sesión de Evaluación de Carteles correspondiente, ya que miembros del Comité Científico pasarán a visitarlo y a hacerle algunas preguntas sobre su trabajo.

Su cartel deberá tener un tamaño de 90 cm de ancho x 100 cm de alto. Los puntos a evaluar serán: diseño, visibilidad del texto, organización de la estructura, calidad y relevancia del trabajo.

Para cualquier duda relacionada con su participación en el congreso por favor comuníquese a [soporte@congresomicologia.org](mailto:soporte@congresomicologia.org)

Atentamente,

Mesa directiva

Asociación Mexicana de Micología Médica

**Presidenta**

Dra. Francisca Hernández Hernández.

**Vice-presidente**

Dr. Lucio Vera Cabrera.

**Secretaría**

Dra. Edith Sánchez Paredes.

**Tesonera**

Dra. Patricia Manzano Gayosso.

**Vocal**

Dra. Laura R. Castañón Olivares.

**Vocal**

BIOL. Elva Bazán Mora.

**Vocal**

QFB. Erika Córdova Martínez.

Unidad de Micología Departamento de Microbiología y Parasitología Facultad de Medicina, UNAM, Av. Universidad 3000 Ciudad Universitaria, C.P. 04510 Delegación Coyoacán, CDMX.

Tel. (0155) 96 23 24 59

Correo: [asocmexmico@gmail.com](mailto:asocmexmico@gmail.com)

## **AGRADECIMIENTOS.**

A la Universidad Nacional Autónoma de México, a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, mi casa de estudios, por formarme como profesionista con un sentido de responsabilidad y amor por mi carrera.

En especial, agradezco a mis asesores por la paciencia para ayudarme a culminar este trabajo, al Dr. Tonatiuh Alejandro Cruz Sánchez y Dra. Betsabé Rodríguez Pérez, del laboratorio 6 de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la FES Cuautitlán.

Al M. en C. Francisco Rodolfo González Díaz por el apoyo técnico para el desarrollo de la microscopía de fluorescencia y análisis estadístico, en el laboratorio 4 y 6 de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la FES Cuautitlán.

A los profesores que integran el jurado, por sus observaciones muy acertadas a mi trabajo.

En general a todos los profesores que son parte de mi formación académica dentro de la Universidad.

*A mis padres, Jaime y María Esther, por darme la vida y amarme con toda su alma.*

*A Shanti, por enseñarme a nunca rendirme.*

*A mis tíos y mis hermanos.*

# ÍNDICE

Índice de figuras.....	ix
Índice de tablas.....	x
Abreviaturas.....	xi
Glosario.....	xii
<b>1. Resumen.....</b>	<b>13</b>
<b>2. Marco teórico.....</b>	<b>14</b>
<b>2.1 El propóleo.....</b>	<b>14</b>
<i>2.1.1 Generalidades.....</i>	<i>14</i>
<i>2.1.2 Composición química.....</i>	<i>15</i>
<i>2.1.4 Actividad biológica.....</i>	<i>19</i>
<i>2.1.5 Actividad antifúngica.....</i>	<i>22</i>
<b>2.2 Candida sp. ....</b>	<b>22</b>
<i>2.2.1 Características generales.....</i>	<i>22</i>
<i>2.2.2 Factores de virulencia.....</i>	<i>24</i>
<i>2.2.3 Epidemiología.....</i>	<i>25</i>
<b>2.3 Antifúngicos.....</b>	<b>26</b>
<b>2.4 Microscopía de fluorescencia.....</b>	<b>28</b>
<b>3. Justificación.....</b>	<b>30</b>
<b>4. Hipótesis.....</b>	<b>31</b>
<b>5. Objetivos.....</b>	<b>32</b>
<b>5.1 Objetivo general.....</b>	<b>32</b>
<b>5.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>32</b>
<b>6. Metodología.....</b>	<b>33</b>
<b>6.1 Diagrama experimental.....</b>	<b>33</b>
<b>6.2 Especificaciones químicas.....</b>	<b>34</b>
<i>6.5.1 Determinación cualitativa de flavonoides.....</i>	<i>34</i>
<i>6.5.2 Determinación cualitativa de fenoles.....</i>	<i>34</i>
<i>6.5.3 Determinación cuantitativa de fenoles totales.....</i>	<i>34</i>
<i>6.5.4 Determinación cuantitativa de flavonoides.....</i>	<i>35</i>
<b>6.6 Actividad antifúngica.....</b>	<b>36</b>
<i>6.6.1 Obtención de cepas.....</i>	<i>36</i>
<i>6.6.2 Identificación de género y especie.....</i>	<i>36</i>

6.6.3 Prueba de difusión en agar. ....	36
6.6.4 Microtécnica de dilución en caldo para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración fungicida mínima (CFM). ....	37
6.7 Tratamiento de EEP sobre las diferentes especies de Candida. ....	38
6.8 Evaluación de integridad de la pared celular por microscopia de fluorescencia. ....	39
6.9 Análisis de estadístico. ....	40
7. Resultados y discusión. ....	40
7.1 Especificaciones químicas. ....	40
7.1.1 Determinación cualitativa de fenoles totales y flavonoides. ....	40
7.1.2 Determinación cuantitativa de fenoles y flavonoides totales. ....	41
7.2.1 Identificación de género y especie. ....	42
7.2.3 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Fungicida (CMF) por la microtécnica de dilución en caldo. ....	45
7.4 Evaluación de integridad de la pared celular por microscopía de fluorescencia. ....	47
9. Conclusiones ....	55
9. Bibliografía ....	56

## Índice de figuras.

- Figura 1. Compuestos fenólicos
- Figura 2. Recolección de propóleo y propóleo en greña.
- Figura 3. Composición química de la membrana de una célula micótica.
- Figura 4. Mecanismos de acción de los antimicóticos.
- Figura 5. Distribución de los discos impregnados con el EEP sobre el medio de cultivo.
- Figura 6. Microplaca de 96 pozos para la microtécnica de dilución en caldo.
- Figura 7. Determinación cualitativa de fenoles totales y flavonoides.
- Figura 8. Informe de la identificación de género y especie de *Candida* por el método Vitek<sup>®</sup>2
- Figura 9. Prueba de difusión en placa para la evaluación del efecto antifúngico del EEP sobre: A) *C.albicans*; B) *C.lusitaniae*; C) *C.tropicalis*.
- Figura 10. Microtécnica de dilución en caldo para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración fungicida mínima (CFM) para las diferentes especies de *Candida* con el EEP.
- Figura 11. Micrografías obtenidas por microscopía de fluorescencia del tratamiento con EEP sobre *C. albicans* a las 24 horas.
- Figura 12. Micrografías obtenidas por microscopía de fluorescencia del tratamiento con el EEP sobre *Candida* a las 48 horas.
- Figura 13. Micrografías obtenidas por microscopía de fluorescencia de los tratamientos con el EEP en las tres especies de *Candida* a las 24 horas.
- Figura 14. Micrografías obtenidas por microscopía de fluorescencia de los tratamientos con el EEP en las tres especies de *Candida* a las 48 horas.
- Figura 15. Efecto del EEP sobre *C.albicans* a diferentes tiempos.

Figura 16. Efecto del EEP sobre *C. lusitaniae* a diferentes tiempos.

Figura 17. Efecto del EEP sobre *C. tropicalis* a diferentes tiempos.

### **Índice de tablas.**

Tabla 1. Composición general del propóleo.

Tabla 2. Clasificación taxonómica de *Candida sp.*

Tabla 3. Antifúngicos y su clasificación.

Tabla 4. Especificaciones químicas para el análisis de propóleos, de acuerdo a la NOM-003-SAG, 2017.

Tabla 5. Resultados de la determinación cualitativa de flavonoides en el propóleo de Morelos.

Tabla 6. Resultados de las medidas de los halos de inhibición a las 48 horas de incubación.

Tabla 7. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Fungicida (CMF).

## **Abreviaturas.**

CFT	Concentración de fenoles totales
CMF	Concentración Mínima Fungicida
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
DMSO	Dimetilsulfóxido
EEP	Extracto Etanólico de Propóleo
FC	Reactivo de Folin-Ciocalteu
FESC	Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán
MH	Müeller-Hinton
mg	Miligramo
mL	Mililitro
µg	Microgramo
µL	Microlitro
NOM	Norma Oficial Mexicana
SDA	Agar Dextrosa Sabouraud
UFC	Unidades Formadoras de Colonias

## **Glosario.**

**Antifúngico:** cualquier sustancia capaz de producir una alteración de las estructuras de una célula fúngica que consiga inhibir su desarrollo, alterando su viabilidad o capacidad de supervivencia.

**Fenoles:** Son compuestos con un grupo –OH unido a un anillo de benceno (también llamado hidroxibenceno o ácido carbólico). Compuestos orgánicos, los cuales se consideran como metabolitos secundarios de las plantas, que presentan al menos un grupo hidroxilo unido a un anillo aromático y pueden contener o no otro grupo funcional.

**Flavonoides:** Es el término genérico con que se identifica a una serie de metabolitos secundarios de las plantas. Sintetizados a partir de una molécula de fenilalanina y 3 de malonil-CoA.

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

**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 debido a que tienen una distribución restringida en el reino vegetal y se sintetizan en pequeñas cantidades.

**Propóleo:** Nombre genérico que se da a las sustancias resinosas recolectadas y procesadas por las abejas de la vegetación circundante al apiario. De aspecto resinoso, su color puede variar dependiendo de su origen desde el rojo, amarillo-rojizo, amarillo-oscuro, verde castaño, pardo o negro, con sabor amargo y ligeramente picante.

**Resina:** Secreción orgánica que producen muchas plantas, particularmente las coníferas.

## 1. Resumen

El propóleo es una sustancia resinosa de origen natural, de composición compleja, producto de la recolección que realizan las abejas obreras (*Apis mellifera*) de la secreción de árboles y arbustos. Sus propiedades organolépticas son variables que dependen de su origen botánico. Su composición química es 50-55% resinas, 30-40% ceras, 5-10% aceites esenciales, 5% polen y 5% sustancias orgánicas y minerales.

Las propiedades antimicrobianas del propóleo mexicano han sido probadas frente a bacterias como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella tiphy* y en hongos como *Candida albicans* y *Cryptococcus neoformans*.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la actividad antifúngica del extracto etanólico del propóleo proveniente del estado de Morelos sobre tres cepas de origen clínico del género *Candida* (*albicans*, *lusitaniae* y *tropicalis*), comprobando el daño estructural celular a través de microscopía de fluorescencia.

La composición química del propóleo de acuerdo a la NOM-003-SAG/GAN-2017, el análisis cualitativo del extracto etanólico del propóleo (EEP), mostró la presencia de flavonoides y fenoles. El análisis cuantitativo del EEP, presentó que el 20.4% son fenoles y el 15.2% flavonoides totales. La actividad antifúngica mediante la prueba de sensibilidad se presentó a partir de los 10 mg/mL. La determinación de la concentración mínima inhibitoria fue 0.3mg/mL para *C. albicans* y 2.5 mg/mL para *C. lusitaniae* y *C. tropicalis*. La determinación de la concentración mínima fungicida para *C. albicans* fue de 1.25 mg/mL y para *C. lusitaniae* y *C. tropicalis* fue de 5mg/mL, estas dosis se emplearon para el tratamiento y evaluación del daño provocado por el EEP sobre la pared celular, mediante microscopía de fluorescencia, utilizando las tinciones de blanco de calcoflúor y yoduro de propidio, para determinar la viabilidad celular. El análisis de las imágenes demostró el daño estructural provocado por el EEP sobre la pared celular, compuesta principalmente de quitina a partir de las 24 horas del inicio del tratamiento, existiendo diferencias significativas entre las cepas con tratamiento y sin tratamiento (Wilcoxon,  $p < 0.01$ ). Por otro lado, el efecto del EEP parece disminuir en *C. albicans* y *C. tropicalis*, sucediendo lo contrario en *C. lusitaniae*, en la cual se mantiene el efecto.

El EEP del estado de Morelos presentó actividad antifúngica contra las tres especies de *Candida*.

## 2. Marco teórico

### 2.1 El propóleo.

#### 2.1.1 Generalidades.

El propóleo es una sustancia compleja, de origen natural, resinosa, presenta una coloración de verde pardo a castaño oscuro, casi negro, de sabor amargo o picante, según su origen botánico. Es producto de las secreciones que las abejas obreras (*Apis mellifera*) recolectan de diversas especies de árboles y arbustos como: álamos (*Populus alba*), sauces (*Salix babilonica*), abedules (*Betula allegheniensis*), alisos (*Alnus sp.*), castaños silvestres (*Castanea sativa*), pinos (*Pinus sp.*), enebros (*Juniperus communis*) y algunas plantas herbáceas (Carrillo, *et.al.*, 2011), resultando una mezcla de resinas, bálsamos aromáticos, ceras, aceites y polen. Su consistencia es muy variable, depende de su origen y de la temperatura. Hasta los 15°C es duro y se torna maleable a medida que aumenta la temperatura. Su punto de fusión oscila entre 60 a 70°C, llegando en algunos casos hasta 100°C. Es soluble en alcohol y en solventes tales como éter, acetona, benceno, tricloroetileno y entre otros (Noriega-Salmón, 2014).

De acuerdo con Toreti (2013), el uso que las abejas le dan al propóleo es múltiple, entre ellas se encuentran: dar forma y mantenimiento a la colmena, controlar la temperatura recubriendo las grietas para evitar corrientes de aire, así como evitar la entrada a la colmena de insectos, roedores o reptiles pequeños, los cuales quedan momificados por efecto del propóleo, esto evita su descomposición, manteniendo un ambiente aséptico. Además de evitar la formación de hongos. Estas funciones son importantes, ya que demuestran las propiedades antimicrobianas que posee el propóleo (Bucio, 2016).

Los productos de la colmena se han utilizado con fines nutritivos y medicinales desde la antigüedad, se tienen registros de la antigua civilización mesopotámica en las tablillas de cerámica, donde existen indicios del uso terapéutico de la miel en ginecología, oftalmología, curación de heridas y masajes. En el antiguo Egipto el propóleo era utilizado por los sacerdotes para embalsamar cadáveres, pues ya se conocían sus propiedades de conservación. También era utilizado como ungüento para la cicatrización de heridas. En los papiros de Ebers y BeekBadog se menciona a la miel, cera y propóleo como sustancias utilizadas en medicina. Mientras que en la antigua Grecia fue utilizado por Hipócrates y

Aristóteles para el tratamiento de heridas y llagas, debido a sus efectos cicatrizantes, así como para infecciones oculares (Vargas, *et. al.*, 2013).

De acuerdo a lo reportado por Noriega-Salmón (2014), en el continente americano, antes de la conquista algunas civilizaciones consideraban al propóleo y miel como “alimentos de fuego”, pues creían que tenía la capacidad de suministrar calor y energía a quienes se encontraban enfermos. Más tarde fue utilizado por los misioneros españoles para tratar estados de fiebre. Hasta hoy, en diversas regiones se cree que consumir la miel sin refinar ni purificar, así como el propóleo es útil para infecciones del tracto urinario, digestivo y respiratorio.

En 1909, científicos rusos comenzaron a estudiar y analizar las propiedades de la miel y el propóleo. Alexandrov, publicó un artículo llamado: “El propóleo como medicamento”, donde recomendaba su uso terapéutico (Noriega-Salmón, 2014).

El propóleo es ampliamente utilizado para prevenir y tratar resfriados, heridas y úlceras, reumatismo, esguinces, enfermedades del corazón, diabetes y caries dental debido a sus diversas propiedades biológicas, tales como antiinflamatorias, antimicrobianas, antioxidantes, antitumorales, entre otras. Su amplia aplicación en la medicina moderna ha desarrollado estudios sobre su composición química, ya que los efectos observados en el tratamiento de enfermedades y padecimientos son el resultado de la acción sinérgica de sus complejos componentes (Salamanca-Grosso, 2017).

### ***2.1.2 Composición química.***

La composición química del propóleo es compleja, debido a su origen botánico, zona geográfica y clima. Considerando que es una mezcla procedente de diversas fuentes como exudados de plantas y árboles, secreciones de las abejas y componentes de la colmena, su composición general de acuerdo con Vargas, *et al.* (2013), es la siguiente:

**Tabla 1. Composición general del propóleo**

<b>Elementos</b>	<b>Porcentaje</b>
Resinas	50-55%
Ceras	30-40%
Aceites esenciales o volátiles	5-10%
Polen	5%
Sustancias orgánicas y minerales	5%

Mediante el desarrollo de las técnicas de separación y purificación como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), cromatografía en capa fina, cromatografía de gases, espectroscopia de masas y técnicas de resonancia, se han identificado más de 300 compuestos incluyendo flavonoides, terpenos, ácidos fenólicos, ésteres, azúcares, hidrocarburos y elementos minerales (Zhang, 2014).

#### *Compuestos fenólicos.*

Los fenoles son compuestos orgánicos aromáticos que contienen el grupo hidroxilo como su grupo funcional. En las plantas funcionan como productos secundarios de su metabolismo. Los compuestos fenólicos de las plantas son un grupo heterogéneo de productos con más de 10.000 compuestos. Algunos son solubles en solventes orgánicos, otros son glucósidos o ácidos carboxílicos y por lo tanto solubles en agua, y otros son polímeros muy grandes e insolubles.

Los compuestos fenólicos son los principales metabolitos secundarios de las plantas, su presencia en el reino animal se debe a la ingestión de éstas. Los fenoles son sintetizados *de novo* por diversas especies vegetales, aunque existen factores ambientales que están relacionados con su síntesis. Su función principal es actuar como fitoalexinas, es decir, previenen ataques fúngicos y bacterianos en las plantas, dar soporte mecánico en la atracción de los polinizadores y dispersantes de frutos, en la absorción de la radiación ultravioleta dañina, además de contribuir a la pigmentación, por ejemplo, las antocianidinas generan diversos colores como el rojo, naranja, azul, púrpura o violeta (Muñoz et al., 2007).

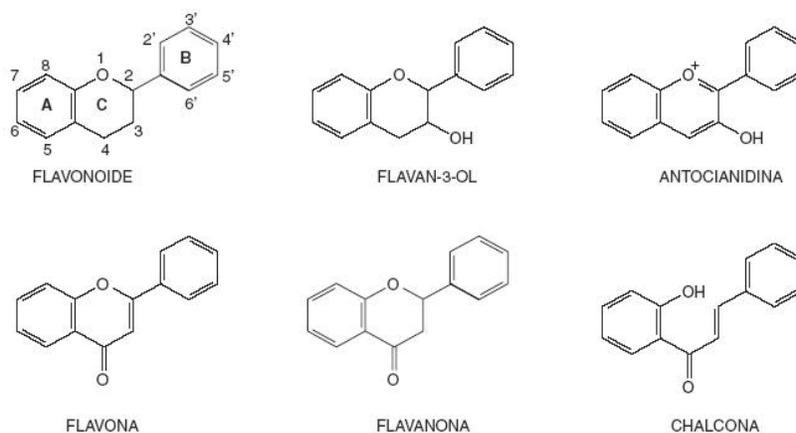


Figura 1. Algunos compuestos fenólicos presentes en alimentos.

Tomado de Muñoz, *et al.*, 2007.

Existen dos rutas implicadas en la biosíntesis de los compuestos fenólicos: la ruta del ácido siquimico y la ruta del ácido malónico. La primera, es precursor de diversos intermediarios metabólicos aromáticos, tales como como los taninos, el cloranfenicol, el ácido 4-aminobenzoico, los fenilpropanoides, los lignanos, los aminoácidos aromáticos (tirosina, fenilalanina y triptófano), así como sus derivados: glucósidos cianogénicos aromáticos, aminas biógenas aromáticas, catecolaminas, betalainas, melaninas, bisindoles, los flavonoides, las fenazinas y diversos alcaloides (Taiz & Zeiger, 2006). 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 (Amallesh, 2011).

### *Flavonoides.*

Los flavonoides son los principales componentes del propóleo, dicha importancia se debe a que son farmacológicamente activos. Se le atribuyen efectos biológicos antibacterianos, antivirales, antiinflamatorios, entre otros y la cantidad de estos compuestos en un propóleo determina su pureza y calidad (Zhang, 2014).

Los flavonoides son pigmentos naturales presentes en los vegetales, los cuales protegen al organismo del daño producido por agentes oxidantes, como los rayos ultravioleta, la

contaminación ambiental, entre otros. Según su estructura química, los flavonoides en el propóleo se clasifican en: flavonas, flavonoles, flavononas, flavonoles, chalconas, dihidrochalconas, isoflavonas, isohidroflavonas, flavanos, isoflavanos y neoflavonoides. De 2000 a 2012, se identificaron 112 nuevos flavonoides en diferentes tipos de propóleos. Además de glicósidos de flavonoides, los cuales hasta el momento eran desconocidos en la composición del propóleo (Huang, *et al.* 2014).

Los flavonoides son sintetizados a partir de una molécula de fenilalanina y tres moléculas de malonil-CoA, a su vez, ésta reacción bioquímica está mediada por dos enzimas: la chalcona sintasa y la chalcona flavonona isomerasa. Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular que comparten una estructura común: el difenilpirano (C6-C3-C6), que son compuestos con dos anillos fenilos (A y B) ligados a través de un anillo heterocíclico C de pirano.

En función de sus características estructurales se pueden clasificar en seis grupos: 1) los flavanos, como la catequina, 2) los flavonoles, representados por la quercetina, 3) las flavonas, como la diosmetina, 4) las antocianidinas, 5) las isoflavonas, representados por la genisteina, 6) los flavanonoles, como la taxifolina.

En su estructura química contienen un número variable de grupos hidro-fenólicos, que son quelantes del hierro y otros metales de transición e incluso presentan una gran capacidad antioxidante que depende de las propiedades redox de sus grupos hidroxifenólicos y de la acción inhibitoria de radicales hidroxilo y superóxido, altamente reactivos en la cadena de peroxidación lipídica. Las características estructurales importantes para su función son: a) La presencia en el anillo B de la estructura catecol u o-dihidroxi; b) La presencia de un doble enlace en la posición 2,3; c) la presencia de un grupo -OH en la posición 3 y 5 (Miguel, *et.al*, 2014).

### ***2.1.3 Calidad del propóleo.***

Los lineamientos de calidad para el propóleo se rigen desde sus características organolépticas (color, sabor, consistencia, olor), las cuales tienen relación directa con los

métodos de extracción, así como el cuidado e higiene en el almacenamiento y conservación del propóleo.

Los estándares de calidad determinados en cada país se refieren al producto en “crudo o bruto”, o bien, a sus extractos. En México, la secretaria de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación (SAGARPA) publicó la NOM-003 SAG/GAN-2017. En la cual se especifican los procedimientos para la producción y procesamiento del propóleo, en dicha norma se mencionan además de las características organolépticas, pruebas químicas cualitativas y cuantitativas de los principios activos (fenoles y flavonoides) que demuestran la calidad del propóleo.



Figura 2. Recolección de propóleo y propóleo en greña.

(Ramos y Miranda, 2016)

#### ***2.1.4 Actividad biológica.***

Los flavonoides tienen una gran capacidad antioxidante, la cuál ha sido reconocida en diversos estudios, ya que pueden unirse a las enzimas transportadoras de hormonas y al DNA. Además, pueden quelar iones metálicos como el  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ , catalizar el transporte de electrones y depurar los radicales libres (Velásquez & Montenegro, 2017). Debido a su efecto biológico, se han podido emplear en enfermedades como diabetes mellitus, cáncer, cardiopatías, infecciones virales, bacterianas, y fúngicas. También ha sido empleado como antiinflamatorio. Se ha demostrado, como menciona Noriega-Salmón (2014), que protegen de la fotooxidación a la vitamina E en la membrana celular, inhiben la

oxidación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) por lo que evitan la formación del ateroma y reducen la citotoxicidad de las LDL.

En los estudios realizados desde la mitad del siglo XX hasta hoy se ha buscado definir la actividad farmacológica de los componentes del propóleo, aunque se ha descubierto que existe una acción sinérgica entre ellos para funcionar como principios activos y tener actividad biológica. Entre esas propiedades destaca su capacidad antioxidante, antibacteriana, antiviral, antifúngica, cicatrizante, antiinflamatorio, antitumoral, anestésica e inmunomoduladora (Noriega-Salmón, 2014).

Los flavonoides poseen capacidades antioxidantes, ya que son capaces de eliminar los radicales libres y proteger la membrana celular contra la peroxidación lipídica. Otro de los principales componentes del propóleo es el éster fenil ácido cafeico, el cual bloquea la producción de radicales libres. Estudios *in vivo*, en animales y humanos han demostrado esta capacidad del propóleo mediante una disminución de la peroxidación lipídica, la cual se encuentra asociada con enfermedades cardiovasculares (Salamanca-Grosso, 2013)

La propiedad antibacteriana del propóleo se atribuye también a los flavonoides como pinocembrina, galangina, pinobanksina, además del éster bencil del ácido cumárico y mezclas de ésteres del ácido cafeico. De acuerdo a diversos autores, el mecanismo de acción es multifactorial, ya que depende del sinergismo entre todos los compuestos del propóleo. Su acción antibacteriana es compleja y aún no está bien definida, pero autores como Viuda-Martos, *et al.* (2008), sugieren como probables causas la desorganización de la pared celular, membrana citoplasmática y citoplasma. Además de la inhibición de la ARN polimerasa e inhibición de la síntesis de proteínas.

Se han realizado diversos estudios frente a bacterias de interés clínico, con resultados favorables, sobretodo contra bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus* beta-hemolítico, según estudios realizados por Kujumgiev, *et. al.* (1999). Más tarde Kalogeropoulos y col. (2009), estudiaron el efecto de varios extractos etanólicos de propóleos frente a varias bacterias tales como: *Salmonella typhimurium*, *Enterobacter aerogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus cereus*, y *Listeria monocytogenes*, llegando a la

conclusión de que se pueden utilizar aditivos de propóleo para la conservación de alimentos.

Lotti. *et al.* (2010), evaluaron la capacidad antimicrobiana de varios extractos de propóleo ante *Helicobacter pylori*, siendo efectiva gracias a los flavonoides: pinocembrina, galangina y crisina. La evidencia clínica asocia a esta bacteria con gastritis, ulcera duodenal e incluso cáncer gástrico.

Amoros, *et al.* (1992), confirmaron la efectividad del propóleo frente al virus herpes tipo 1 y 2, además de poliovirus, en donde encontraron que reduce la síntesis de DNA viral, siendo responsables de esta acción los flavonoides, ácido cafeico y ácido ferúlico.

Como se mencionó en los antecedentes históricos, el propóleo siempre se ha utilizado en heridas como cicatrizante, esto se debe a la capacidad que tiene de acelerar la epitelización, la división celular, y la prevención del desarrollo de procesos inflamatorios. En algunos estudios citados por Bucio (2016), se atribuye al ácido cafeico la capacidad de reducir la producción de interleucinas y prostaglandinas presentes en el proceso de inflamación. Por otro lado, estudios realizados en modelos animales, se observó el efecto anestésico total de córnea hasta por una hora, lo cual es más de 50 veces el efecto de la procaína. Además, el propóleo estimula la actividad de los macrófagos y aumenta el número de linfocitos, incrementándose la respuesta inmune. Esto se ha observado en diferentes trabajos, por ejemplo en ratones infectados con el virus de influenza A, que fueron tratados con propóleo se aumentaron los linfocitos T, hubo una mayor actividad de fagocitosis y menos mortalidad, en comparación con aquellos utilizados como testigo no tratados con propóleo (Yang, 2014).

De acuerdo a su actividad antitumoral, se ha sugerido que el propóleo funciona como protector en la carcinogénesis colónica, evitando el desarrollo de lesiones preneoplásicas, estudios realizados en ratones al suministrar propóleo en dosis de 30 mg/kg se redujo considerablemente el número de criptas aberrantes en el colón distal, por la exposición a un agente anticancerígeno. Según los estudios reportados por Wagh (2013), los flavonoides presentes en el propóleo funcionan como protectores ante la toxicidad de agentes quimioterapéuticos o de radiación.

### **2.1.5 Actividad antifúngica.**

Desde los años 80's se han realizado estudios para demostrar la actividad antifúngica del propóleo, se han probado 23 cepas del género *Candida* de procedencia clínica humana, encontrando notablemente su actividad fungistática a una concentración de 0.5 mg/mL. En otros estudios, se determinó su efectividad como fungicida a una concentración de 3 a 7 mg/mL, siendo *C. albicans* la especie más sensible, seguida de *C. tropicalis*, *C. krusei* y *C. guilliermondii* (Quintero-Mora, et. al, 2008).

El uso del propóleo se ha recomendado para evitar infecciones en la cavidad oral causadas por levaduras. En otros estudios, se menciona que los extractos etanólicos pueden ser auxiliares en el tratamiento de candidosis oral en pacientes con VIH, siendo efectivo como la nistatina, clotrimazol, el econazol y el fluconazol (Martins, 2002). Además, se ha demostrado su efectividad en candidosis vaginal, con un 61% de pacientes con mejoría después del tratamiento con propóleo.

## **2.2 *Candida sp.***

### **2.2.1 Características generales.**

*Candida sp.* es un hongo unicelular, también denominado levadura, es un microorganismo comensal en el humano presente en las mucosas: oral, digestiva y genital. Bajo ciertas condiciones de inmunidad y exposición al hongo es causante de micosis cutáneas, mucocutáneas y sistémicas. La especie de mayor relevancia clínica es *Candida albicans*, aunque existen al menos otras 20 especies causantes de infecciones en humanos (Biasoli, 2013).

*Candida sp.* es considerado un hongo dimórfico, es decir, puede desarrollarse como levadura y filamento. En su forma de levadura, las células presentan forma redonda u ovalada, éstas miden aproximadamente de 2 a 4 micras; sin embargo, en tejidos infectados también se han identificado formas filamentosas cuyos extremos presentan diámetros de 3 a 5 micras. Las levaduras o blastoesporas se reproducen por gemación, proceso que implica la producción de una nueva célula proveniente de la superficie de la blastoespora (Bonifaz, 2015).

**Tabla 2. Clasificación taxonómica de *Candida sp.***

<b>Reino</b>	<b>Fungi</b>
Filo	Deuteromycota
Subfilo	Deuteromicotina
Clase	Deuteromycetes
Subclase	Blastomycetidae
Familia	Cryptococcaceae
Genero	<i>Candida</i>
Especies	<i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. lusitaniae</i> , <i>C. guilliermondi</i> , <i>C. krusei</i> .

Cuando el brote o yema ha crecido y se encuentra en su tamaño óptimo, se suscita la división celular y se forma un tabique o septo entre las dos células. La forma filamentosa del hongo (hifa), es una estructura microscópica tubular, la cual contiene múltiples unidades celulares divididas por septos y puede surgir a partir de blastosporas o de hifas existentes. Esta crece continuamente por extensión apical. La apariencia microscópica de todas las especies de *Candida* es similar; todas las levaduras son Gram positivas, pero en algunas ocasiones la forma de las blastosporas puede variar de ovoide a elongada o esférica. Microscópicamente, *C. albicans* presenta dimorfismo, el cual es una transformación de la forma ovoide de las blastosporas (levaduras) gemantes a hifas. El dimorfismo le permite evadir los mecanismos de defensa relacionados con la inmunidad celular del huésped. En forma de levadura se comporta como saprofita, conviviendo en simbiosis con el huésped, mientras que, en forma de hongo filamentoso, se comporta como un parásito patógeno produciendo síntomas en el huésped. Macroscópicamente, en agar Sabouraud crece formando colonias blancas, blandas, cremosas y lisas (Biasoli, 2013).

La composición química de *C. albicans* está representada por 20-40% de proteínas y 30-50% de polisacáridos, mientras que la proporción de lípidos es variable. La fracción lipídica va a depender de la cepa, edad del cultivo, condiciones ambientales y del origen de la fuente de carbono. La pared celular de *C. albicans* está compuesta principalmente por los

polisacáridos manán, glucán y quitina. Aunque la síntesis de los componentes de la pared celular está dinámicamente influenciada por las condiciones de crecimiento y por los estadios metabólicos. El polisacárido manán representa aproximadamente entre 15.2% y 22.9% del peso seco y poco más de 40% de los polisacáridos de la pared celular del hongo. El D-Glucán  $\beta$ -1-3 y el D-Glucán  $\beta$ -1-6 constituyen entre 47% y 60% del peso seco de la pared celular. Otros componentes han sido reportados, tales como proteínas en cantidades que oscilan entre 6% y 25%, lípidos entre 1% y 7% y Quitina entre 0,6% y 9% del peso de la pared celular (Bonifaz, 2015).

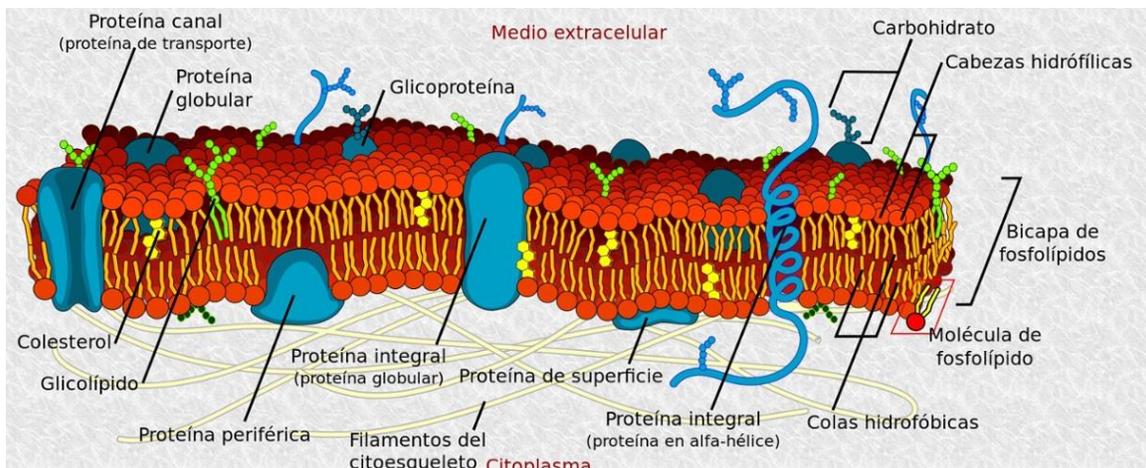


Figura 3. Composición química de la membrana de una célula micótica.

(Biasoli, 2014)

### 2.2.2 Factores de virulencia.

No existen un único factor de patogenicidad de *Candida*, sino que diversos autores proponen una combinación de diferentes factores en la infección. Los principales son los siguientes:

- ❖ Capacidad que tienen las levaduras de adherirse a diferentes superficies mediante una adhesina y un receptor de la célula del hospedero. La adherencia de las especies de *Candida* en las mucosas es un paso necesario para iniciar la infección, tanto local como diseminada. *C. albicans* y *C. tropicalis*, muestran una capacidad de adherencia mayor, lo cual implica mayor virulencia (Biasoli, 2013).

- ❖ Producción de hifas y pseudohifas, lo cual aumenta su capacidad invasiva a las células epiteliales, su capacidad de adherencia y aumenta la resistencia a la fagocitosis. Una vez dentro de las células, las levaduras continúan su crecimiento, lo cual ocasiona daños histológicos severos (Cararach-Tur, 2013).
- ❖ Producción de enzimas: proteinasas, que hidrolizan las uniones peptídicas y fosfolipasas, que hidrolizan los fosfoglicéridos (Castrillón-Rivera, 2013).
- ❖ Formación de biopelículas o biofilms. La cual consiste en una densa red de levaduras, hifas y pseudohifas, recubiertas por una matriz extracelular y frecuentemente asociada con bacterias. Esta matriz proporciona a la levadura protección contra factores hostiles como la inmunidad del huésped y los antimicrobianos, debido a que es una malla de proteínas y azúcares (Castrillón-Rivera, 2013).

### ***2.2.3 Epidemiología.***

Es una infección oportunista y cosmopolita. De las más frecuentes en seres humanos, pues es causante del 7.5% de las micosis, 25% de las micosis superficiales y cerca del 80% de las infecciones de origen fúngico en hospitales. No distingue edad, sexo y raza (Biasoli, 2013).

De acuerdo con Gow y Hube (2012), *Candida albicans* es la especie más importante y aislada en casos de candidiasis. Es parte de la microbiota normal del aparato gastrointestinal, de la mucosa oral (31-55%) y vaginal (13%), así como también de la piel periorificial de individuos sanos (25-30%). *Candida sp.* coexiste en equilibrio con otros microorganismos en el organismo humano, es comensal, pero cuando por diversos factores se pierde el equilibrio se torna patógeno, causando infecciones superficiales, mucocutáneas e invasivas

*Candida albicans* es aislada en la cavidad oral entre 70-80%, *C. glabrata* y *C. tropicalis* entre 5-8% y se observa 10% de combinaciones de *C. albicans* con otras especies como *C. glabrata*, *C. parapsilopsis*, *C. krusei* o *C. tropicalis*, mientras que el aislamiento de otras especies es poco frecuente (Perea, 2010).

Los factores que predisponen a que *Candida sp.* sea un agente patógeno en el organismo son los siguientes (Asmi & Tamer, 2014):

- ❖ Estados fisiológicos como infancia, vejez o embarazo.
- ❖ Factores locales como humedad, calor, oclusión y heridas.
- ❖ Enfermedades endocrinas y metabólicas como obesidad, diabetes, hiper e hipoparatiroidismo, insuficiencia tiroidea, hiperuricemia, acrodermatitis enteropática y deficiencia de hierro.
- ❖ Medicamentos como antibióticos, glucocorticoides, estrógenos, anticonceptivos, citostáticos y radioterapia.
- ❖ Enfermedades debilitantes como neoplasias, infecciones, inanición, leucemia, linfomas, anemia aplásica y trasplantes.
- ❖ Deficiencias nutricionales o del sistema inmune.
- ❖ Disrupción de la integridad de las mucosas por trauma, cirugías, prótesis dentales, radiación, ulceración o neoplasias.
- ❖ Cuerpos extraños, tales como prótesis valvulares cardíacas, prótesis articulares, monitores intravasculares, catéteres venosos, arteriales, urinarios y peritoneales.
- ❖ Hiperalimentación endovenosa constante, respiración asistida, drogadicción.
- ❖ Cirugías gastrointestinales, genito-urinarias y cardíacas.
- ❖ Quemaduras extensas, cirugías dentales y diálisis peritoneal.

### **2.3 Antifúngicos.**

Un antifúngico o antimicótico es una sustancia capaz de producir una alteración en las estructuras de una célula fúngica, con el objetivo de inhibir su desarrollo, alterando su viabilidad o capacidad de supervivencia, de manera directa o indirecta, lo que facilita el funcionamiento de los sistemas de defensa del huésped. Existe una gran variedad de antimicóticos con diferentes estructuras y mecanismos de acción, su clasificación está basada principalmente en su estructura química y sitio de acción, como se observa en la tabla 3 (Biasoli, 2013).

**Tabla 3. Antifúngicos y su clasificación.**

<b>GRUPO FARMACOLOGICO</b>	<b>TIPO DE ANTIMICÓTICO</b>	<b>SITIO DE ACCIÓN</b>
Polienos	Nistatina Natamicina Anfotericina B	Membrana celular: desestabilizadores de la membrana.
Azoles	Imidazol: miconazol, clotrimazol Triazoles: fluconazol, itraconazol, ketoconazol. Triazoles de segunda generación: voriconazol, ravuconazol, posaconazol.	Membrana celular: inhibidores de la síntesis de ergosterol.
Alilaminas	Terbinafina Naftifina	
Lipopéptidos	Papulacandinas Triterpenos glicosilados Equinocandinas: caspofungina, Inidulofungina, micafungina	Pared celular: inhibidores de los componentes de la pared.
Pirimidinas fluoradas	5-Fluorocitosina	Núcleo: inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos.
Otros	Griseofulvina	Inhibidores de la mitosis fúngica
	Sordarinas Oxaboroles	Inhibidores de la síntesis de proteínas
	Diversos como: Amorolfina, ciclopiroxolamina. Derivados tiocarbamatos: tolnaftato y tolciclato.	

(Biasoli, 2016)

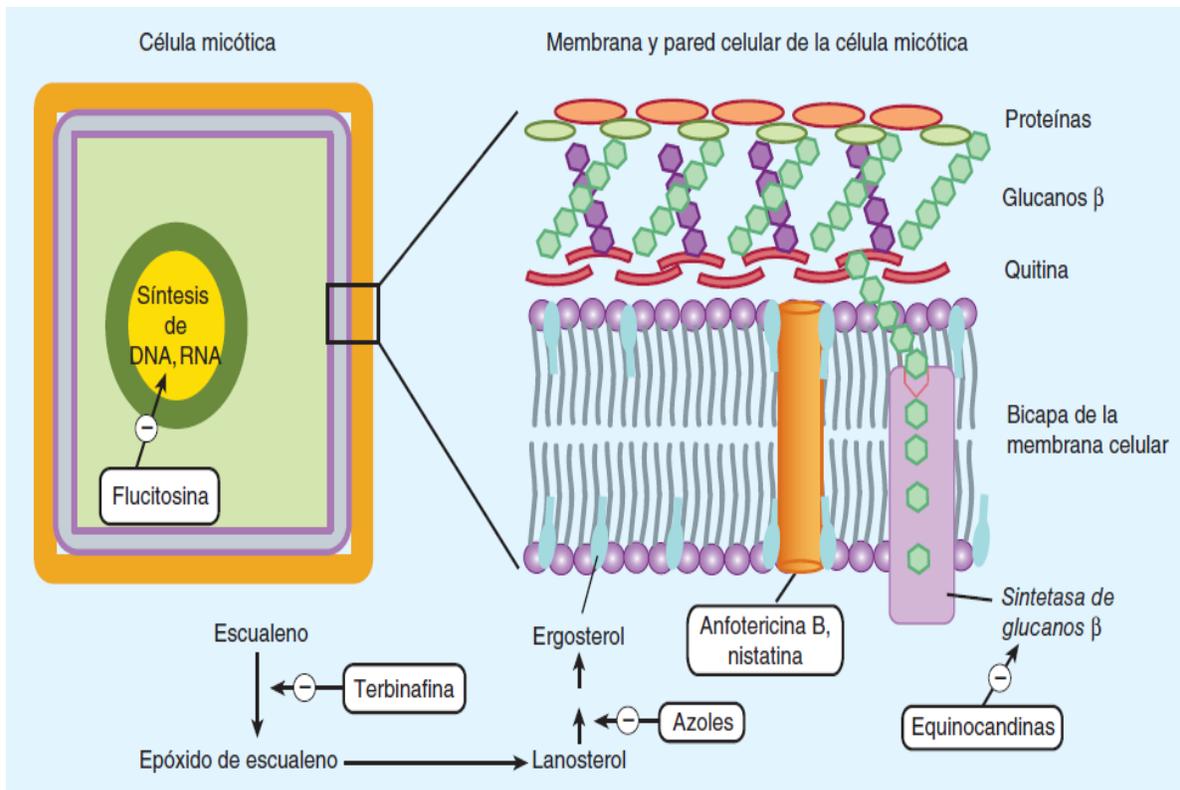


Figura 4. Mecanismos de acción de los antimicóticos.

(Katzung, 2013)

El contenido de esterol en la célula micótica y animal es diferente, las complejas partículas lipídicas llamadas esterolatos representan aproximadamente el 25% de la membrana celular. En las células animales el colesterol es el esterol que predomina, mientras que en las células micóticas el primario es el ergosterol. Éste último es el sitio de acción de polienos, azoles y alilaminas, como se menciona en la tabla 3, ya que dicha estructura celular desempeña una importante función en la división y metabolismo celular (Katzung, 2013).

#### 2.4 Microscopía de fluorescencia.

Ciertas sustancias naturales o artificiales poseen la propiedad que cuando son estimuladas por energía de cierta longitud de onda (por ejemplo, energía radiante invisible como la radiación ultravioleta o radiación luminosa violeta o azul) absorben esta energía y emiten

fotones que integran ondas visibles de luz, de longitudes de onda siempre mayores que las ondas con las que fueron excitadas. Este fenómeno se denomina fluorescencia. La luz emitida se observa en forma de destellos coloreados sobre un fondo oscuro (Montalvo, 2010).

Existen una serie de sustancias colorantes artificiales que también emiten fluorescencia cuando son excitadas. Estas sustancias se denominan fluorocromos y se emplean para demostrar una serie de componentes celulares o tisulares pues al unirse de manera específica a algunos de ellos y ser excitados por radiación ultravioleta o longitudes de onda menores (azul, violeta) resplandecen ofreciendo imágenes de colores diferentes, generalmente de longitudes de ondas azules, verdes, amarillas, naranjas o rojas (Montalvo, 2010).

La técnica del blanco de calcoflúor se basa, por una parte, en la propiedad que tiene dicha sustancia de emitir fluorescencia al ser activada por radiación ultravioleta, y por otra, en la afinidad que presenta por la celulosa y la quitina presentes en la pared celular de los organismos fúngicos (Ramos, 2006).

El yoduro de propidio es ampliamente utilizado en conjunción con la anexina V para determinar si las células son viables, apoptosis o necrosis a través de diferencias en la integridad de la membrana de plasma y permeabilidad. Se utiliza con más frecuencia que otras manchas nucleares porque es económico, estable y un buen indicador de la viabilidad celular, basado en su capacidad para excluir de colorante en las células vivas. La capacidad del yoduro de propidio para entrar en una célula depende de la permeabilidad de la membrana. (Murillo, 2016).

### **3. Justificación**

En los últimos años el aumento y prevalencia de las infecciones producidas por *Candida sp*, su resistencia a los antimicóticos y los efectos secundarios que estos provocan en los pacientes ha llevado a evaluar nuevas alternativas contra esta levadura. Se sabe de las diversas propiedades terapéuticas del propóleo debido a su contenido de compuestos fenólicos como flavonoides, entre las que destaca su actividad antimicrobiana. Diversos autores reportan que es efectivo contra bacterias, virus y hongos. Por lo anterior en el presente trabajo se evaluará su actividad antifúngica contra cepas de procedencia clínica del género *Candida sp*. observando el daño en la pared celular mediante microscopía de fluorescencia.

#### **4. Hipótesis**

Si el propóleo contiene compuestos fenólicos que poseen actividad antifúngica, al llevar a cabo un tratamiento con extracto etanólico de propóleo del estado de Morelos sobre diversas especies de *Candida*, entonces se podrá comprobar el daño estructural causado por este mediante microscopía de fluorescencia.

## 5. Objetivos

### 5.1 Objetivo general.

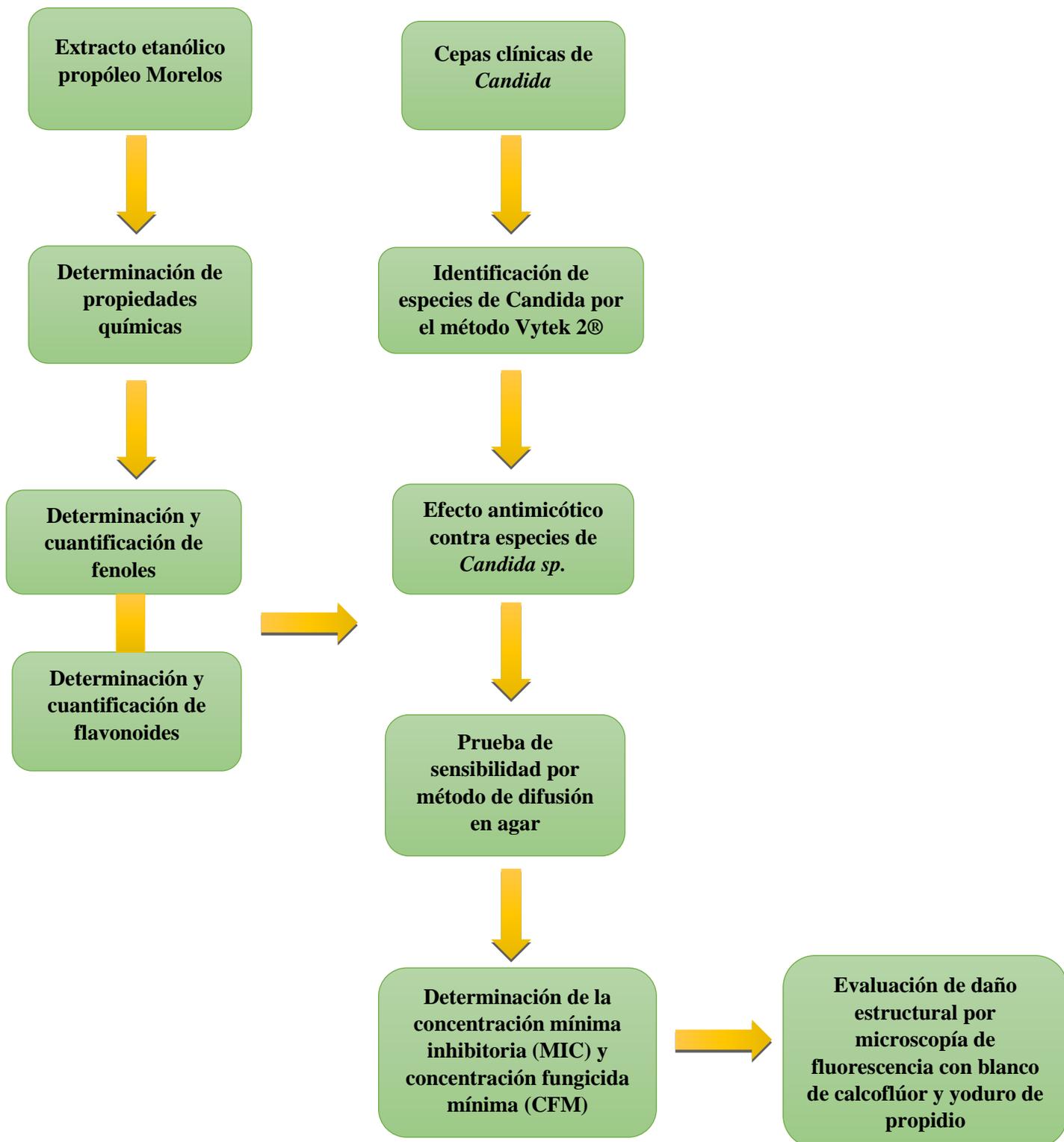
Evaluar la actividad antifúngica del extracto etanólico de un propóleo del estado de Morelos sobre el crecimiento de diferentes especies de *Candida*, provenientes de aislamientos clínicos de origen humano, comprobando el daño estructural celular por medio de microscopia de fluorescencia.

### 5.2 Objetivos específicos.

- ❖ Cuantificación de fenoles y flavonoides del extracto blando.
- ❖ Recolección de diversas especies de levaduras del género *Candida* a partir de muestras clínicas.
- ❖ Evaluación de la actividad antifúngica por el método de susceptibilidad microbiana por difusión en agar.
- ❖ Determinación de la concentración mínima inhibitoria y concentración fungicida mínima para las especies de *Candida* utilizadas.
- ❖ Evaluación del daño estructural sobre especies de *Candida* por la técnica de microscopia de fluorescencia con la tinción de blanco de calcoflúor y yoduro de propidio.

## 6. Metodología

### 6.1 Diagrama experimental.



## 6.2 Especificaciones químicas.

Las especificaciones químicas del propóleo del estado de Morelos se realizaron de acuerdo con la NOM-003-SAG/GAN-2017.

**Tabla 4. Especificaciones químicas para el análisis de propóleos, de acuerdo a la NOM-003-SAG, 2017.**

<b>Determinación cualitativa</b>	<b>Parámetros</b>
Flavonoides	Presencia
Fenoles totales	Presencia
<b>Determinación cuantitativa</b>	<b>Parámetros</b>
Compuestos fenólicos	Expresados como equivalentes de ácido gálico: mínimo 5% (peso/peso)
Flavonoides	Expresados como equivalentes de quercetina: mínimo 0.5% (peso/peso)

### ***6.5.1 Determinación cualitativa de flavonoides.***

Se pesaron 200 mg del propóleo en bruto y se añadió 1 mL de etanol al 70%. Se añadió una gota de hidróxido de sodio al 20% y se observó un cambio de coloración de amarillo a naranja, lo que indica la presencia de flavonoides.

### ***6.5.2 Determinación cualitativa de fenoles.***

Se pesaron 200 mg del propóleo en bruto y se añadió 1 mL de etanol al 70%. Se agregó una gota de la solución de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  al 1% y se observó un precipitado con una coloración de azul a negro, lo que indica la presencia de fenoles.

### ***6.5.3 Determinación cuantitativa de fenoles totales.***

Se preparó una solución estándar de ácido gálico en agua destilada con una concentración de 0.2 mg/mL y una solución de carbonato de sodio al 20% ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) en agua destilada. A partir de la solución estándar de ácido gálico de 0.2 mg/mL, se tomaron alícuotas para obtener concentraciones seriadas de 0.00625, 0.0125, 0.025, 0.05, 0.1 y 0.2 mg/mL.

Se preparó una solución estándar de concentración 0.2 mg/mL del propóleo en bruto y se disolvió en etanol al 70%. Se tomó una alícuota de 250  $\mu$ L y se agregaron 750  $\mu$ L de agua destilada para obtener una concentración de 0.05 mg/mL.

Una vez preparados ambos sistemas se tomó 1 mL de cada concentración y se añadieron 6 mL de agua destilada. Se adicionaron 500  $\mu$ L del reactivo de Folin-Ciocalteu (Sigma<sup>®</sup>) y se dejó en reposo 5 minutos. Posteriormente se adicionaron 1.5 mL de la solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> para aforar con agua destilada hasta un volumen de 10 mL, se observó un cambio de color a azul. Pasadas 2 horas a temperatura ambiente para que se lleve a cabo la reacción, se determinó la absorbancia a 760 nm en un espectrofotómetro de absorción UV-VIS (DLAB<sup>®</sup> SP-UV1000). Se graficó la concentración contra la absorbancia para obtener la curva patrón de ácido gálico. Los resultados se expresan como equivalentes de ácido gálico/g de extracto o en porcentaje (%).

#### ***6.5.4 Determinación cuantitativa de flavonoides.***

Se preparó una solución estándar de quercetina en metanol de 1 mg/mL y una solución de tricloruro de aluminio en agua destilada al 2%. Posteriormente, se pesaron 500 mg del EPP y se disolvieron en 10 mL de metanol.

Se preparó una curva de calibración a partir de la solución estándar de quercetina de 1 mg/mL. Se tomaron alícuotas correspondientes para obtener concentraciones seriadas de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 y 90  $\mu$ g/mL (ppm).

Se preparó un blanco de muestra, tomando 3 mL de la solución del EEP (500 mg EEP/10 mL de metanol) y se agregaron 3 mL de metanol.

Al tener todos los sistemas anteriores preparados, se adicionaron a cada tubo 3 mL de la solución de AlCl<sub>3</sub>, esperando 10 minutos para que se llevara a cabo la reacción y determinar la absorbancia a 415 nm en un espectrofotómetro de absorción UV-VIS (DLAB<sup>®</sup> SP-UV1000). Se graficó la concentración contra la absorbancia para obtener la curva patrón de quercetina. El contenido total de flavonoides se expresa como mg de equivalentes de quercetina (QE)/g de extracto o en porcentaje (%).

## 6.6 Actividad antifúngica.

### 6.6.1 Obtención de cepas.

Se utilizaron cepas clínicas de *Candida sp*, las cuales llegaron a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán aisladas de casos clínicos diagnosticados con candidiasis.

### 6.6.2 Identificación de género y especie.

Se identificaron género y especie de las cepas por el método Vitek<sup>®</sup>2, basado en un sistema que utiliza tarjetas con reactivos colorimétricos, las cuales son inoculadas con la suspensión del cultivo microbiano y el perfil de desarrollo es interpretado de forma automática.

### 6.6.3 Prueba de difusión en agar.

Esta es una prueba cualitativa que únicamente reflejó si la muestra a evaluar inhibió el crecimiento microbiano. Para ello, se preparó una solución de cloruro de sodio (NaCl) en agua destilada al 0.9% y se esterilizó en autoclave bajo condiciones 15 lb/120°C por 15 minutos, se preparó agar Müeller-Hinton (MH, BD<sup>®</sup>) suplementado con 2% de glucosa y 0.5µg/mL de azul de metileno en placas y se realizaron diluciones con el extracto etanólico del propóleo con las siguientes concentraciones: 40mg/mL, 30mg/mL, 20mg/mL y 10mg/mL. Se impregnaron 4 sensidiscos de papel Whattman con 10 µL de cada concentración.

Se preparó una suspensión de levaduras en NaCl 0.9% mediante el método de turbidez con el tubo 0.5 del Nefelómetro de McFarland donde se obtiene una aproximada de  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL. A partir de esta suspensión de levaduras en NaCl 0.9%, se inocularon las placas con la técnica de sembrado masivo sobre el agar. Se colocaron los cuatro sensidiscos de las diferentes concentraciones como se observa en la figura 5, incluyendo un disco al centro de la placa con DMSO. Se incubaron a 37°C por 48 h y se midió el halo de inhibición alrededor de los sensidiscos con vernier.

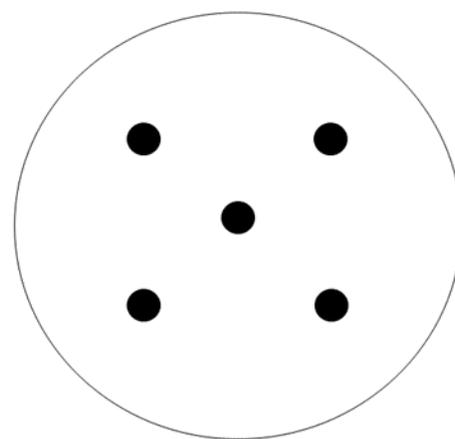


Figura 5. Distribución de los discos impregnados con el EEP sobre el medio de cultivo.

#### **6.6.4 Microtécnica de dilución en caldo para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y concentración fungicida mínima (CFM).**

Mediante esta técnica se determinó la concentración mínima de extracto etanólico de propóleo para inhibir el crecimiento de las especies de *Candida* a tratar (CMI). Así como la concentración a la cual no existe crecimiento de las levaduras, lo cual se conoce como concentración fungicida mínima (CFM).

Se preparó una suspensión de levaduras en NaCl 0.9% mediante el método de turbidez con el tubo 0.5 del Nefelómetro de McFarland donde se obtiene una aproximada de  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL y una solución de azul de tetrazolio al 0.08% (TTC) en agua destilada. Para esta prueba se utilizó como medio de cultivo caldo MH. Se preparó un stock del EEP de concentración 10mg/mL. Se tomaron 100 $\mu$ L del stock y se añadieron a un tubo que contenía 1mL de caldo MH para una concentración final de 2.5mg/mL (solución A).

Se utilizó una microplaca de 96 pozos estéril como se observa en la figura 6 añadiendo 50 $\mu$ L de caldo MH a todos los pocillos. Las filas 1, 2 y 3 se utilizaron para la determinación de *C. albicans*, las filas 4, 5 y 6 para la determinación de *C. lusitaniae*, mientras que las filas 7, 8 y 9 para la determinación de *C. tropicalis*. Las filas 11 y 12 fueron para los controles negativo y positivo, respectivamente. Siendo A y B para *C. albicans*, C y D para *C. lusitaniae*, E y F para *C. tropicalis*.

Se añadieron 50 $\mu$ L de la solución A en cada pocillo desde A:1 hasta A:9. Se tomaron 50 $\mu$ L con ayuda de una pipeta multicanal para transferir dicho volumen a la siguiente fila. Así, sucesivamente hasta llegar a la fila 12, donde se desecharon los últimos 50 $\mu$ L, con el objetivo de realizar la dilución de la muestra. Se añadieron 50 $\mu$ L de la suspensión de levaduras según la especie a determinar a todos los pocillos utilizados. Se selló con papel Parafilm para incubar 37°C/48h.

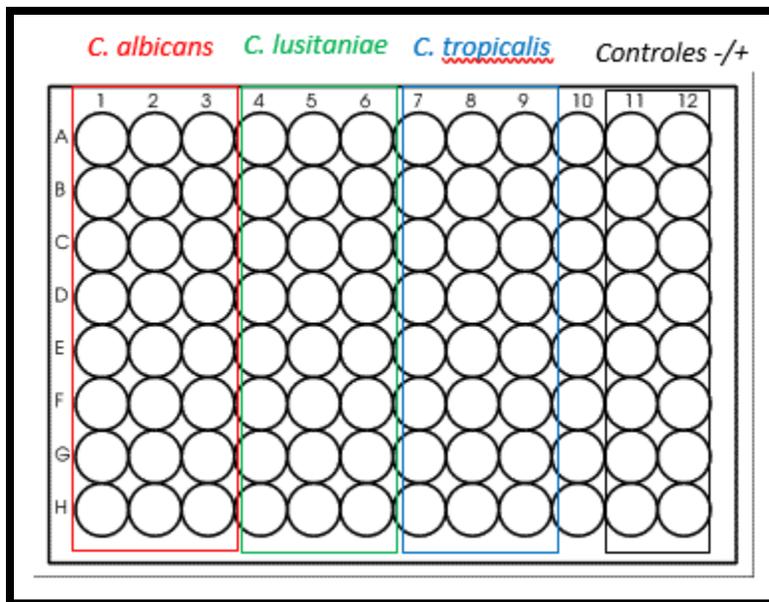


Figura 6. Microplaca de 96 pozos para la microtécnica de dilución en caldo.

Después de incubar la microplaca, se añadieron 50µL de azul de tetrazolio al 0.08% a cada pocillo inoculado, mezclando perfectamente y se incubaron a 37°C/30 minutos. En los pocillos donde hubo crecimiento microbiano se observa una disminución de color y la formación de un botón rojo en el fondo de la concavidad representando la CMI, mientras que la CMF se determinó a partir de los pocillos donde no hubo cambio de color ni precipitado.

### 6.7 Tratamiento de EEP sobre las diferentes especies de *Candida*.

Para evaluar la integridad de la pared celular sobre las especies de *Candida*, se realizó un tratamiento con EEP a partir de la concentración mínima fungicida (CMF) obtenida de la microtécnica de dilución en caldo.

Se preparó una solución patrón del EEP en DMSO con una concentración de 4 mg/mL. Para esta prueba se utilizó como medio caldo MH, preparado como lo indica el proveedor.

Para *C.albicans* se tomaron 50µL de solución patrón y se disolvieron en 1950µL de caldo MH para obtener una concentración de 2.5mg/mL (solución A). En 4 tubos con tapón, se añadieron 1000µL de caldo MH en cada uno. Se preparó la suspensión con *Candida*

*albicans* en los 4 tubos con caldo Sabouraud a una concentración aproximadamente  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL, equivalente a la turbidez del nefelómetro de McFarland. En 2 tubos de la suspensión con caldo MH se añadieron 1000 $\mu$ L de la solución A a cada uno, para obtener una concentración de 2.5 mg/mL en cada tubo. Mientras que los 2 tubos restantes quedan como controles. Se incubaron a 37°C/24h para la primera evaluación con microscopía, posterior a ello volver a incubar a 37°C/24h para la segunda evaluación.

Para *C. lusitaniae* y *C. tropicalis* se tomaron 800 $\mu$ L de la solución patrón y disolver en 7200 $\mu$ L de caldo Sabouraud, para obtener una concentración de 10mg/mL (solución B). En 8 tubos con tapón, se añadieron 1000 $\mu$ L de caldo MH en cada uno. Se preparó la suspensión con *Candida lusitaniae* en 4 tubos con caldo Sabouraud a una concentración aproximadamente  $1.5 \times 10^8$  UFC/mL, equivalente a la turbidez del nefelómetro de MacFarland. Así mismo para *Candida tropicalis*. En 4 tubos con caldo MH se añadieron 1000 $\mu$ L de la solución B a cada uno, para obtener una concentración de 5.0 mg/mL en cada tubo. Mientras que los 4 tubos restantes quedan como controles. Se incubaron a 37°C/24h para la primera evaluación con microscopía, posterior a ello volver a incubar a 37°C/24h para la segunda evaluación.

### **6.8 Evaluación de integridad de la pared celular por microscopia de fluorescencia.**

El daño producido por el extracto etanólico del propóleo en la pared celular de las tres especies de *Candida* se determinó mediante la modificación al método utilizado por Rivera-Yañez et al., (2017) con blanco de calcofluor y yoduro de propidio.

El blanco de calcofluor (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) y el yoduro de propidio [2.4mmol] (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) fueron los reactivos empleados en la técnica. Sobre un portaobjetos, se colocaron 50 $\mu$ L de muestra del microorganismo con ayuda de micropipeta, se añadieron 20 $\mu$ L de blanco de calcofluor y 10 $\mu$ L de yoduro de propidio, mezclando perfectamente. Se dejaron en oscuridad 15 minutos.

Las preparaciones se observaron en el microscopio de fluorescencia (Carl Zeiss, Axioskop40) y se tomaron 10 fotos de diferentes campos por laminilla, con el objetivo de 40x (cámara ccd Evolution VF marca Medio cybernatics) empleando el programa QCCapture 6.0. Cada foto se tomó primero con el filtro para blanco de calcofluor (filtro UV) y posteriormente, se tomó en el mismo campo con el filtro para el yoduro de propidio

(filtro verde). A continuación, se superpusieron las fotografías que se tomaron con ambos filtros mediante el programa Image J64 del Instituto de Salud del gobierno de los Estados Unidos de América, una vez realizado lo anterior se analizaron con el mismo programa para el conteo de las células vivas, las cuales no se tiñen con yoduro de propidio (azules) y muertas, las cuales se tiñen de color rojo, lo cual indica la ruptura de la pared celular de las levaduras.

### **6.9 Análisis de estadístico.**

Los datos obtenidos del conteo celular se analizaron por medio de la prueba no paramétrica de Wilcoxon (Siegel, 1991) empleando el programa estadístico OriginPro versión 8.

## **7. Resultados y discusión.**

El objetivo de evaluar la capacidad antifúngica de un propóleo mexicano, proveniente del estado de Morelos, fue demostrar que los componentes bioactivos del propóleo son efectivos contra cepas clínicas de *Candida sp.*

### **7.1 Especificaciones químicas.**

Los fenoles y flavonoides son parte de los componentes bioactivos del propóleo, para determinar la presencia de estos se utilizó la metodología reportada en la NOM-003-SAG/GAN-2017.

#### **7.1.1 Determinación cualitativa de fenoles totales y flavonoides.**

En la figura 6 se muestran los resultados de la presencia de fenoles y flavonoides en el propóleo del estado de Morelos, de acuerdo a la reacción colorimétrica. En donde se observa que una coloración verde oscuro muestra la presencia de fenoles (Fig. 6, A) y en el caso de los flavonoides una coloración amarilla (Fig. 6, B). Una vez que se comprobó su presencia se procedió a su determinación cuantitativa. Cabe destacar que esos dos compuestos se encuentran en cierta cantidad en la mayoría de los propóleos estudiados hasta la fecha (Rodríguez, 2015; Shuai Huang, et al., 2014; Zhang, 2014).

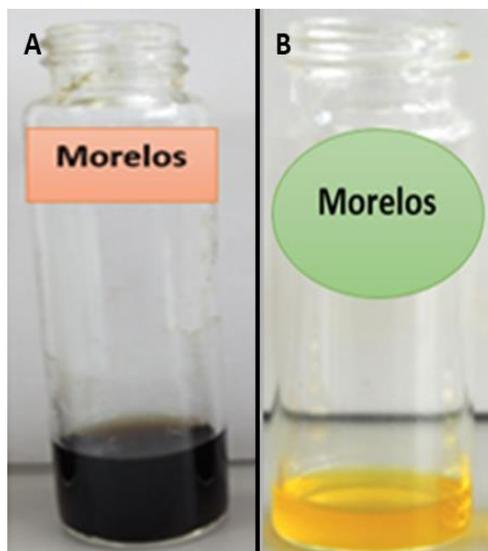


Figura 7. Determinación cualitativa de fenoles totales y flavonoides. A) Fenoles; B) Flavonoides.

#### 7.1.2 Determinación cuantitativa de fenoles y flavonoides totales.

En la tabla 5 se muestran los resultados del análisis cuantitativo de la presencia de fenoles y flavonoides presentes en el EEP del estado de Morelos. Aquí se muestra que el porcentaje obtenido de fenoles y flavonoides totales cumple con lo especificado por la NOM-003-SAG/GAN-2017 para que el EEP sea de calidad y pueda cumplir con sus propiedades antimicrobianas especificadas en la norma antes mencionada.

**Tabla 5. Resultados de la determinación cuantitativa de fenoles y flavonoides totales en el propóleo del estado de Morelos.**

Compuesto	Cantidad	Porcentaje
<b>Fenoles</b> (mg ácido gálico/g EEP)	0.0102	20.4 %
<b>Flavonoides</b> ( $\mu$ g quercetina /g EEP)	7.56	15.12 %

La determinación de estos compuestos es importante, debido a que los flavonoides como la pinocembrina, galangina, pinobanksina, además del éster bencil del ácido cumárico y

mezclas de ésteres del ácido caféico, son compuestos químicos a los que se les atribuyen propiedades antimicrobianas, mediante mecanismos de desorganización de la pared celular, membrana plasmática y citoplasma, además de la inhibición de la RNA polimerasa e inhibición de la síntesis de proteínas (Beltrame, 2013).

## 7.2 Actividad antifúngica.

### 7.2.1 Identificación de género y especie.

Los resultados para la identificación del género y especie de las muestras clínicas que se trataron con el extracto EEP del estado de Morelos se identificaron mediante el sistema VYTEK 2<sup>®</sup>, como se observan en la figura 7.

Nombre del paciente: Examen: 1-1 N° paciente:

Tipo de tarjeta: YST Instrumento de análisis: 000015F235A1 (13011)  
 Tipo de tarjeta: AST-Y507 Instrumento de análisis: 000015F235A1 (13011)

Bionúmero: 6502546065327771

Comentarios:

Información de identificación	Tarjeta: YST	N° de lote: 243369820	Fecha caduc.: 28-ene-2017 12:00 CST
	Finalizado: 02-oct-2016 14:49 CDT	Estado: Final	Tiempo de análisis: 18.25 horas
Organismo seleccionado	99% Probabilidad <b>Candida albicans</b>		
Organismo SRF	Bionúmero: 6502546065327771 Nivel de confianza: Identificación excelente		
Organismos de análisis y pruebas a separar:			
Mensajes análisis:			
Perfil(es) típico(s) contraindicante(s)			

Información de sensibilidad	Tarjeta: AST-Y507	N° de lote: 287389420	Fecha caduc.: 12-ago-2017 13:00 CDT		
	Finalizado: 02-oct-2016 10:04 CDT	Estado: Final	Tiempo de análisis: 13.50 horas		
Antibiótico	CMi	Interpretación	Antibiótico	CMi	Interpretación
Fluconazol	<= 1	S	Micafungina	<= 0.06	S
Voriconazol	<= 0.12	S	Anfotericina B	0.5	S
Caspofungina	<= 0.25	S	Plucitima	<= 1	S

== Antibiótico deducido \* AES modificado \*\* Usuario modificado

Nombre del paciente: Examen: 1-1 N° paciente:

Tipo de tarjeta: YST Instrumento de análisis: 000015F235A1 (13011)  
 Tipo de tarjeta: AST-Y507 Instrumento de análisis: 000015F235A1 (13011)

Bionúmero: 6502546065327771

Conclusiones de AES: Última modificación: 25-ago-2016 10:41 CDT Juego de parámetros: Copia de Global CLSI-based-Natural Resistance 2015

Nivel de confianza: No ha realizado el análisis

Versión instalada de VITEK 2 Systems: 07.01  
 Guía de interpretación de CMi: Copia de Global CLSI-based2.1  
 Nombre de juego de parámetros de AES: Copia de Global CLSI-based-Natural Resistance 2015  
 Última modificación de AES: 25-ago-2016 10:41 CDT

Tel: 01 800 7153510 . www.biomedicos.com.mx . info@biomedicos.com

Página 1 de 2

Versión instalada de VITEK 2 Systems: 07.01  
 Guía de interpretación de CMi: Copia de Global CLSI-based2.1  
 Nombre de juego de parámetros de AES: Copia de Global CLSI-based-Natural Resistance 2015  
 Última modificación de AES: 25-ago-2016 10:41 CDT

Tel: 01 800 7153510 . www.biomedicos.com.mx . info@biomedicos.com

Página 2 de 2

Figura 8. Informe de la identificación de género y especie de *Candida* por el método

Vytek<sup>®</sup>2

### 7.2.2 Prueba de difusión en agar.

La prueba de difusión en agar para evaluar la capacidad antimicrobiana del EEP, para cada una de las especies de *Candida* se realizó por triplicado de acuerdo a la NOM-003-SAG, 2017. Los resultados se muestran en la tabla 6.

**Tabla 6. Resultados de las medidas de los halos de inhibición a las 48 horas de incubación**

<i>Concentración</i> (mg/mL)	<i>C.albicans</i>			$\bar{x}$	<i>C.lusitaniae</i>			$\bar{x}$	<i>C.tropicalis</i>			$\bar{x}$
	(mm)				(mm)				(mm)			
<b>40</b>	9.7	9.2	9.5	9.4	8.7	9.5	9.7	9.3	9.4	9.0	8.8	9.0
<b>30</b>	8.7	8.4	8.7	8.6	8.7	8.7	8.7	8.7	8.5	8.7	8.7	8.6
<b>20</b>	7.2	7.5	7.5	7.4	8.7	7.9	7.9	8.1	7.3	8.7	8.7	8.2
<b>10</b>	7.2	7.3	7.4	7.3	8.3	7.5	7.7	7.8	7.0	8.3	7.9	7.7
<b>DMSO</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

La figura 8 muestra los halos de inhibición alrededor de los sensidiscos impregnados con concentraciones diferentes del EEP. Al centro se observa un disco impregnando con dimetilsulfóxido (DMSO), para comprobar que no hay un efecto antimicrobiano sobre las levaduras. Los resultados de la tabla 6 muestran que el EEP mostró actividad antifúngica a partir de los 10 mg/mL en las tres especies de *Candida*. Es importante mencionar, que el efecto antifúngico fue directamente proporcional a las concentraciones de los sensidiscos. Por otro lado, estos resultados muestran que las tres cepas son sensibles al tratamiento con el EEP. El objetivo de realizar esta prueba fue determinar si el EEP tenía efecto sobre las levaduras a estudiar y a partir de estos resultados determinar la concentración mínima inhibitoria y fungicida.

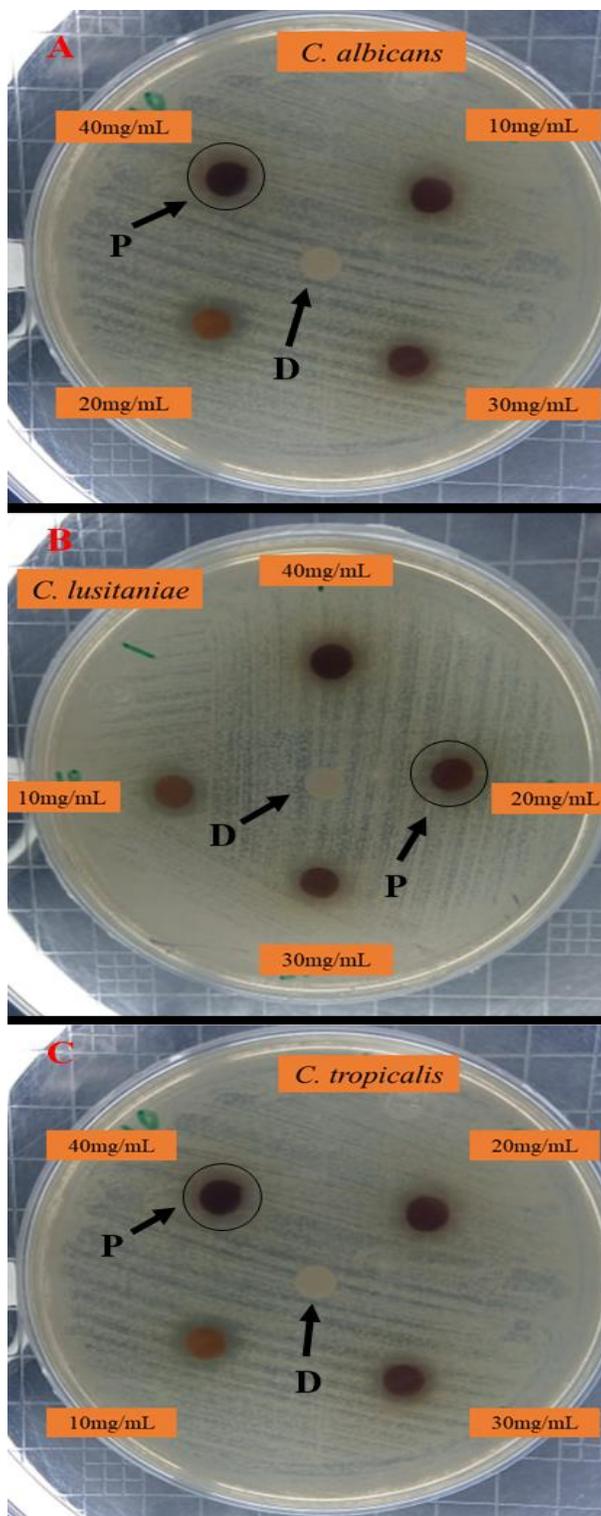


Figura 9. Prueba de difusión en placa para la evaluación del efecto antifúngico del EEP sobre: A) *C.albicans*; B) *C.lusitaniae*; C) *C.tropicalis*. P: disco impregnado con EEP con el halo de inhibición alrededor. D: disco impregnado con DMSO.

**7.2.3 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Fungicida (CMF) por la microtécnica de dilución en caldo.**

Una vez obtenida la actividad antimicrobiana del EEP mediante la prueba de sensibilidad, se determinó la concentración en la cual se inhibe su crecimiento (CMI) y en la cual no existe crecimiento en el medio (CMF). La tabla 7 muestra ambas concentraciones para cada especie, siendo *C.albicans* la más susceptible al EEP, para *C.lusitaniae* y *C.tropicalis* las concentraciones fueron las mismas pero mayores respecto a las de *C.albicans*. La figura 9 muestra los pozos en donde se determinaron las dos concentraciones para cada especie, la CMI se determinó en los pozos donde hubo un precipitado color rojo, mientras que la CMF se determinó en los pozos donde no hubo cambio de color y precipitado.

**Tabla 7. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Fungicida (CMF)**

<b>Especie:</b>	<b>Concentración mínima:</b>	<b>Resultado:</b>
<i>C. albicans</i>	Inhibitoria	0.3 mg/mL
	Fungicida	1.25 mg/mL
<i>C. lusitaniae</i>	Inhibitoria	2.5 mg/mL
	Fungicida	5 mg/mL
<i>C. tropicalis</i>	Inhibitoria	2.5 mg/mL
	Fungicida	5 mg/mL

Los resultados muestran que la CMI para *C. albicans* fue de 0.3 mg/mL y la CFM fue de 1.25 mg/mL, mientras que para *C.lusitaniae* y *C.tropicalis* la CMI fue de 2.5mg/mL y la CMF de 5mg/mL, para ambas especies, lo cual demuestra que la especie más sensible al tratamiento con el EEP del estado de Morelos fue *C.albicans*, mientras que para *C.lusitaniae* y *C.tropicalis* las concentraciones determinadas fueron 4 veces mayores respecto a *C.albicans*.

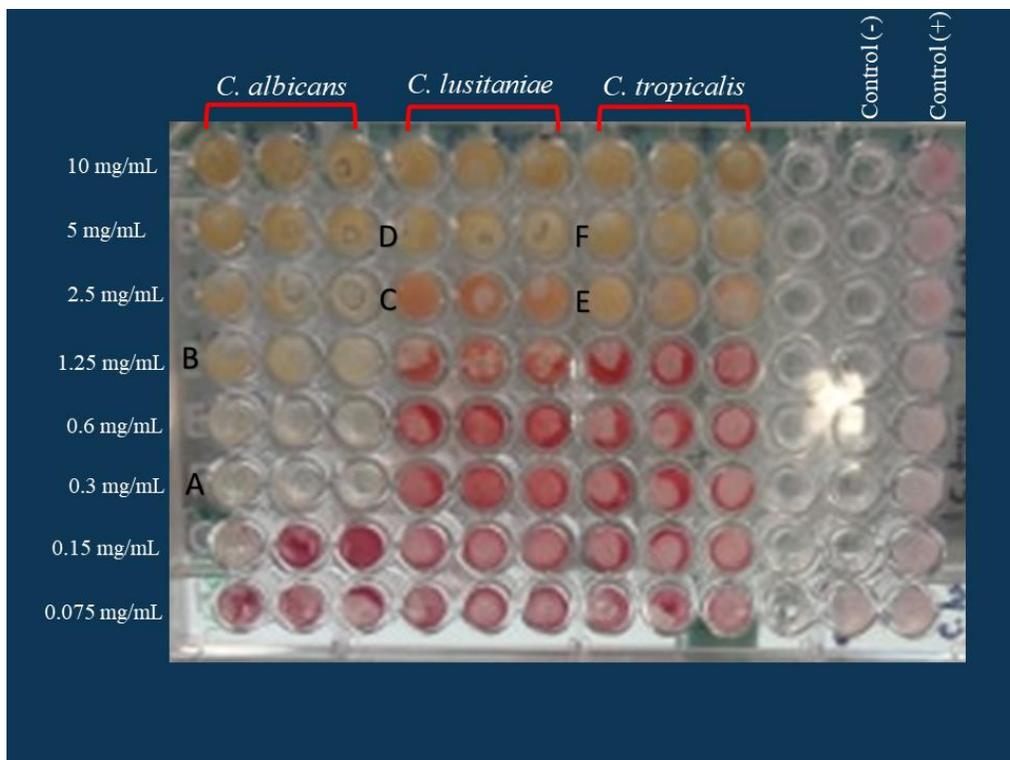


Figura 10. Microtécnica de dilución en caldo para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración fungicida mínima (CFM) para las diferentes especies de *Candida* con el EEP. A) CMI para *C.albicans* (0.3mg/mL); B) CFM para *C.albicans* (1.25mg/mL); C) CMI para *C.lusitanae* (2.5mg/mL); D) CFM para *C.lusitanae* (5mg/mL); E) CMI para *C.tropicalis* (2.5mg/mL); F) CFM para *C.tropicalis* (5mg/mL).

Quintero-Mora (2008), determinó que el propóleo mexicano presenta actividad biológica contra diversas especies de *Candida*, siendo *C. albicans* la especie más susceptible. En el mismo estudio se probaron diversos propóleos contra esta levadura y se determinó que su CMI va de 0.2mg/mL a 12 mg/mL, encontrando la CMF a partir de los 2.4 mg/mL. Por tanto, el propóleo del estado de Morelos presenta una actividad antifúngica similar a la mayoría de los propóleos mexicanos. Además, se demostró su efectividad contra otras dos especies; *C.lusitanae* y *C.tropicalis*, aunque se requirió mayor dosis para llegar a la CMI y CMF.

#### **7.4 Evaluación de integridad de la pared celular por microscopía de fluorescencia.**

Una vez determinadas las concentraciones mínima inhibitoria y mínima fungicida, se realizó el tratamiento con el EEP sobre las tres especies de *Candida*, con la finalidad de comprobar el daño celular causado sobre las levaduras por el EEP mediante la técnica de microscopía de fluorescencia con las tinciones de blanco de calcoflúor y yoduro de propidio. Para esto, se empleó la CMF para cada especie, manteniendo paralelamente un control sin EEP, lo cual permitió observar su efecto fungicida mediante su comparación, además de permitir realizar el conteo para el análisis estadístico.

El blanco de calcoflúor presenta afinidad por la quitina, principal componente de la pared celular de los organismos fúngicos (Ramos, 2006). Al utilizar el filtro UV, se pueden observar las células teñidas de color azul (Fig.10 y 11, A y D), aunque para determinar su viabilidad se utilizó la tinción de yoduro de propidio, considerado un eficiente indicador de viabilidad celular, por su afinidad al DNA (Rivera-Yañez, 2017). Al poner el filtro verde se observaron células teñidas de color rojo (Fig.10 y 11, B y E), lo cual indica que el colorante atravesó la pared celular debido al daño provocado por el EEP, indicando la muerte celular de las levaduras tratadas.

El efecto antifúngico del propóleo es sinérgico entre todos sus componentes, pero estudios realizados por Schilder y Kolsalec (2013), demuestran que los flavonoides como pinocembrina, galangina, pinobanksina, además del éster bencil del ácido cumárico y mezclas de ésteres del ácido cafeíco son los principales compuestos que tienen un efecto de desorganización de la pared celular, membrana citoplasmática y citoplasma.

Posteriormente, se realizó la sobreposición de las imágenes del mismo campo, para obtener una sola imagen y diferenciar entre células vivas y muertas (Fig.10 y 11, C y F). Esto permitió realizar un conteo diferencial para evaluar estadísticamente el efecto del EEP sobre las especies de *Candida* tratadas.

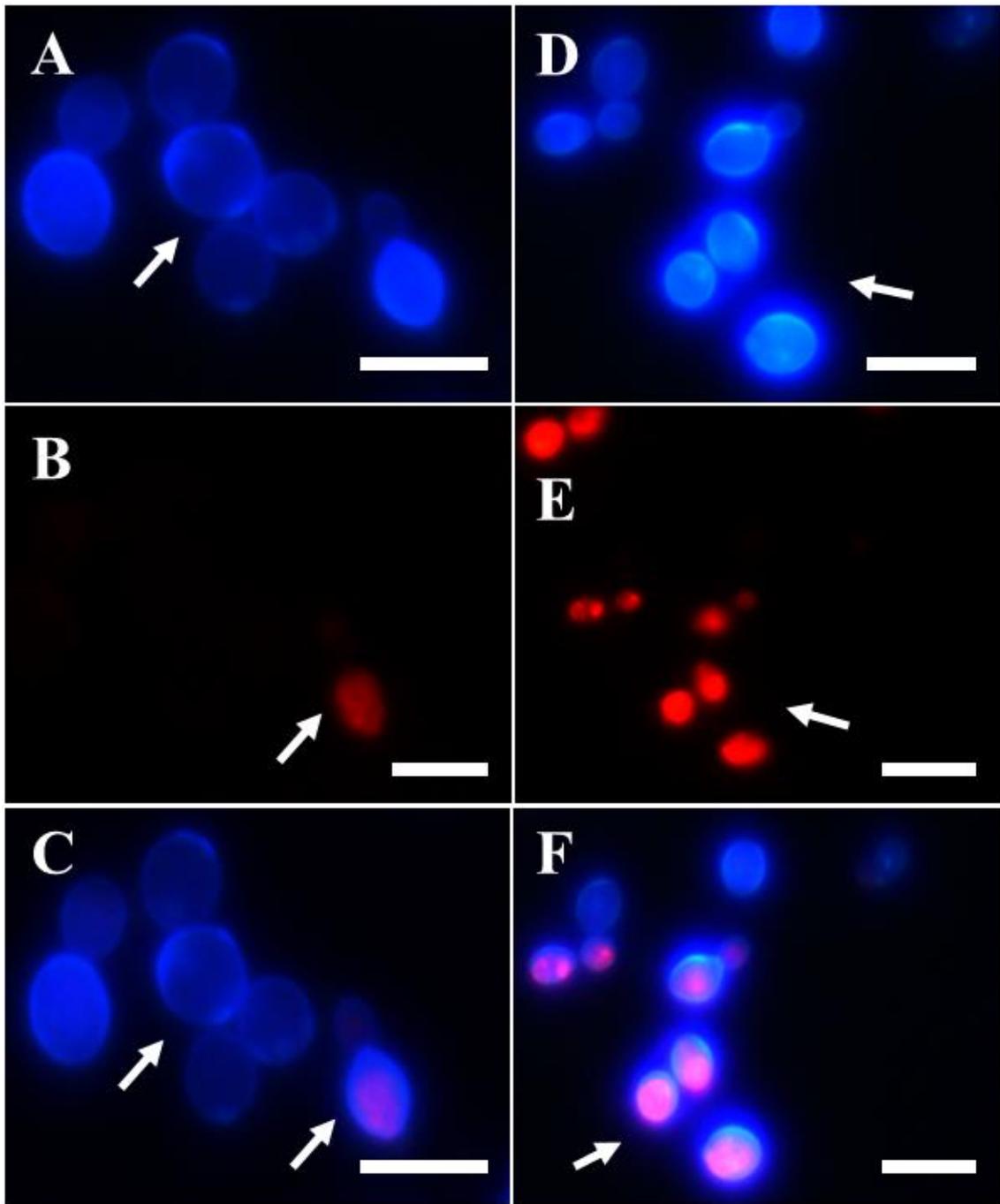


Figura 11. Micrografías obtenidas por microscopía de fluorescencia del tratamiento con EEP sobre *C. albicans* a las 24 horas. A, B y C) *C. albicans* sin tratamiento; D, E y F) *C. albicans* con tratamiento (2.5 mg/mL). Barra 10  $\mu$ m.

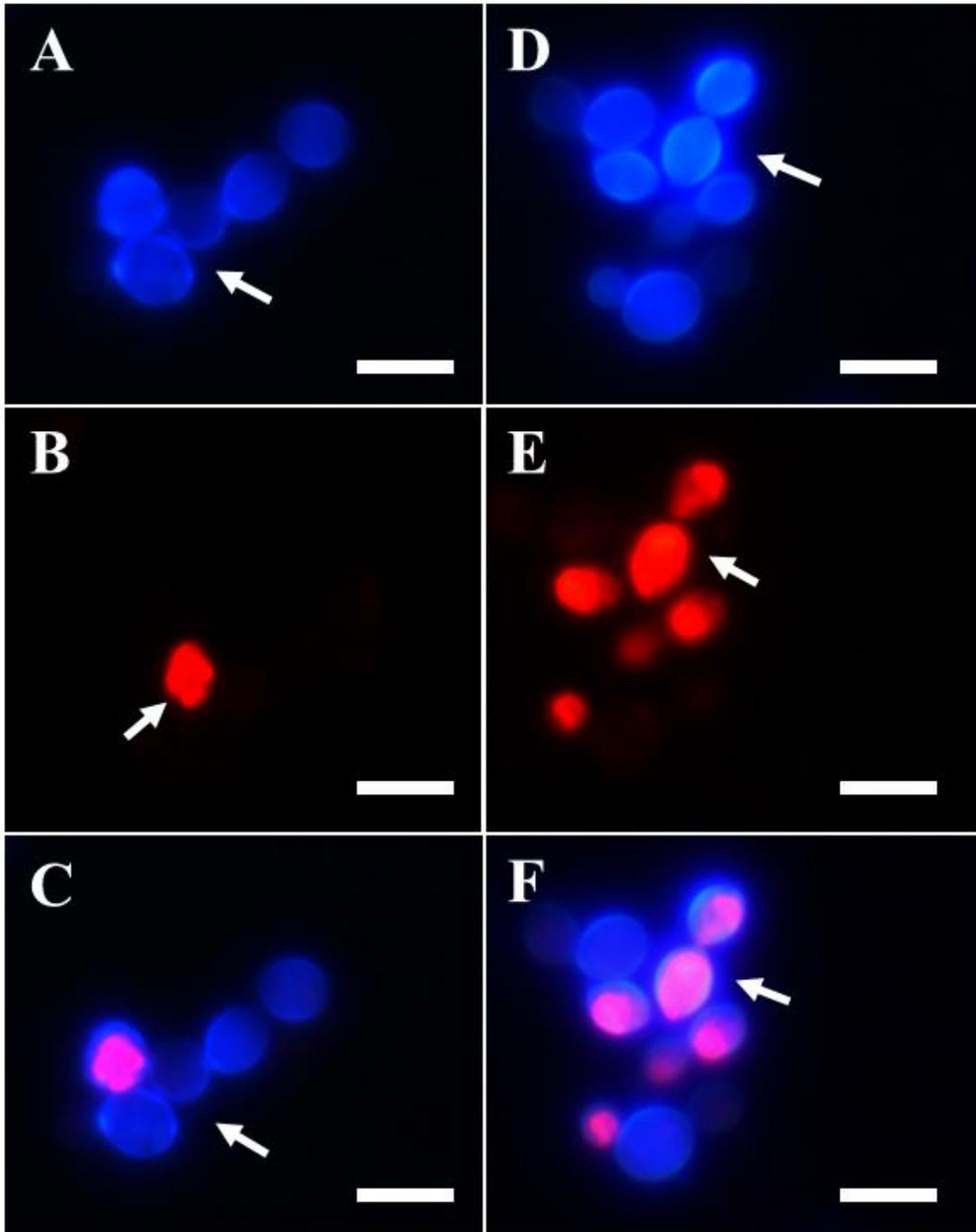


Figura 12. Micrografías obtenidas por microscopía de fluorescencia del tratamiento con EEP sobre *C. albicans* a las 48 horas. A, B y C) *C. albicans* sin tratamiento; D, E y F) *C. albicans* con tratamiento (2.5 mg/mL). Barra 10  $\mu$ m.

El tratamiento con el EEP se realizó por triplicado sobre las tres especies con la CMF determinada para cada una. Para *C. albicans* se utilizó una dosis de 2.5 mg/mL, para *C. tropicalis* y *C. lusitaniae* de 5 mg/mL. Se realizaron dos observaciones a las 24 y 48 horas.

#### *C. albicans*

El EEP presentó efecto antifúngico a partir de las 24 horas, comparando ambos cultivos con y sin tratamiento, como se observa en la figura 12 A y B, lo cual se comprobó estadísticamente al realizar el conteo entre células vivas y muertas. La figura 14 muestra los resultados del análisis estadístico del conteo de células dañadas y muestran una diferencia significativa del número de células vivas de *C. albicans* al compararlas con las células que tuvieron tratamiento, esto demuestra la efectividad del EEP a las 24 horas.

Al realizar el conteo a las 48 horas, el número de células vivas del cultivo con tratamiento aumentó (fig.14), pero sigue siendo significativamente diferente al número de células vivas en el cultivo sin tratamiento. En la figura 13 se observa aún el efecto antifúngico sobre las células, pero menor en comparación con el efecto presentado a las 24 horas.

#### *C. lusitaniae*

Las figuras 12 y 13 (C y D) muestran de manera como su crecimiento total fue menor respecto a *C. albicans* pero se mantiene el efecto antifúngico, no disminuye, caso contrario a *C. albicans*. Por tanto, los resultados indican que *C. lusitaniae* fue la especie más sensible al EEP. Para esta cepa, se observó el efecto antifúngico a partir de las 24 horas, el cual se mantuvo hasta las 48 horas (fig.15), comparando entre el número de células vivas en los cultivos con y sin tratamiento.

#### *C. tropicalis*

Las figuras 12 y 13 (C y F), muestran el efecto antifúngico a partir de las 24 horas, pero hay una disminución de este a las 48 horas, lo cual se comprobó al realizar el conteo. La figura 16 muestra el aumento de células vivas en el cultivo con tratamiento de las 24 a las 48 horas, pero sigue siendo significativamente diferente entre el número de células vivas en el cultivo sin tratamiento. Para esta cepa el EEP tuvo un menor efecto antifúngico.

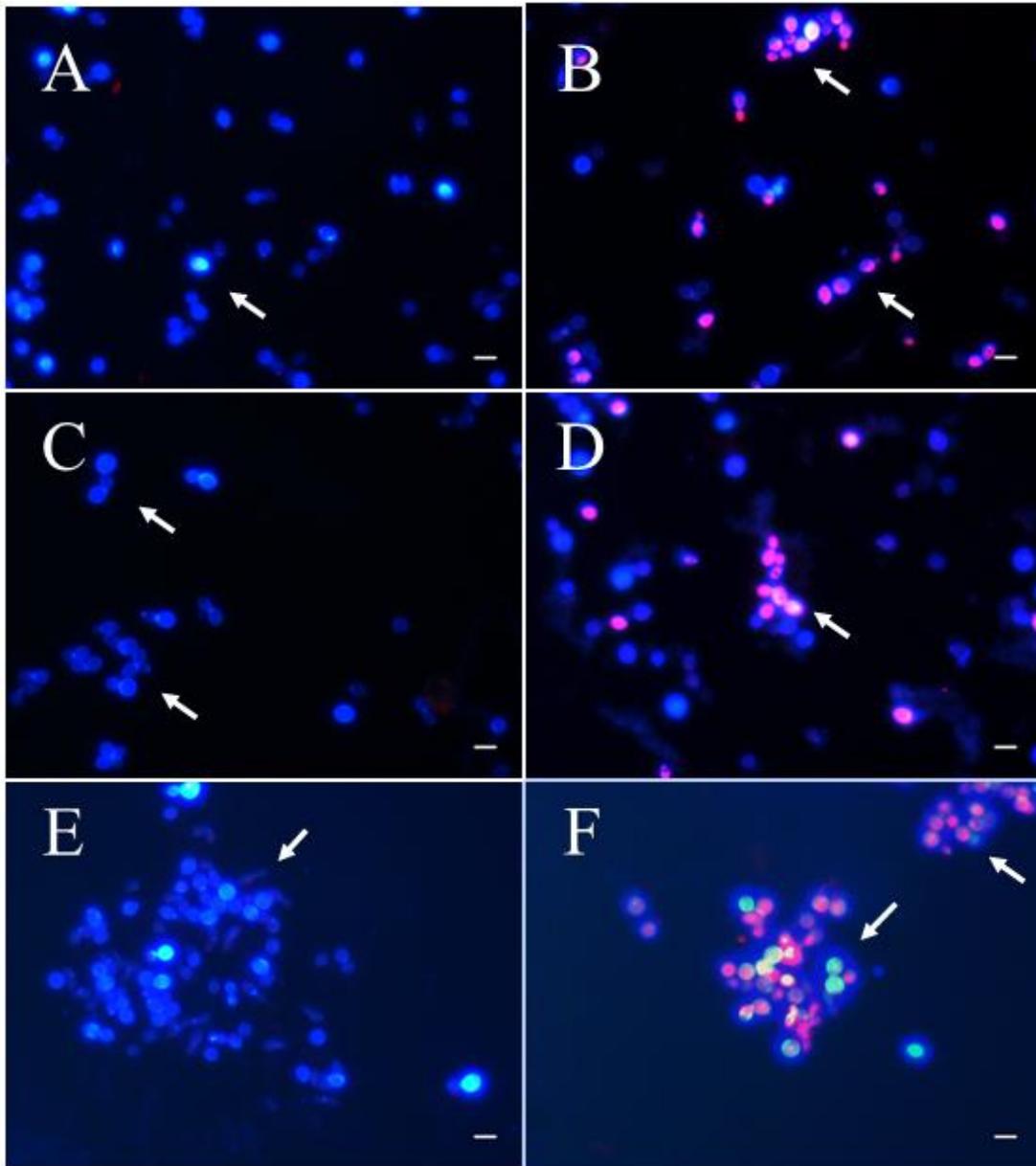


Figura 13. Micrografías obtenidas por microscopía de fluorescencia de los tratamientos con el EEP en las tres especies de *Candida* a las 24 horas. A) *C. albicans* sin tratamiento; B) *C. albicans* con tratamiento (2.5 mg/mL); C) *C. lusitaniae* sin tratamiento; D) *C. lusitaniae* con tratamiento (5 mg/mL); E) *C. tropicalis* sin tratamiento; F) *C. tropicalis* con tratamiento (5 mg/mL). Barra 10 µm.

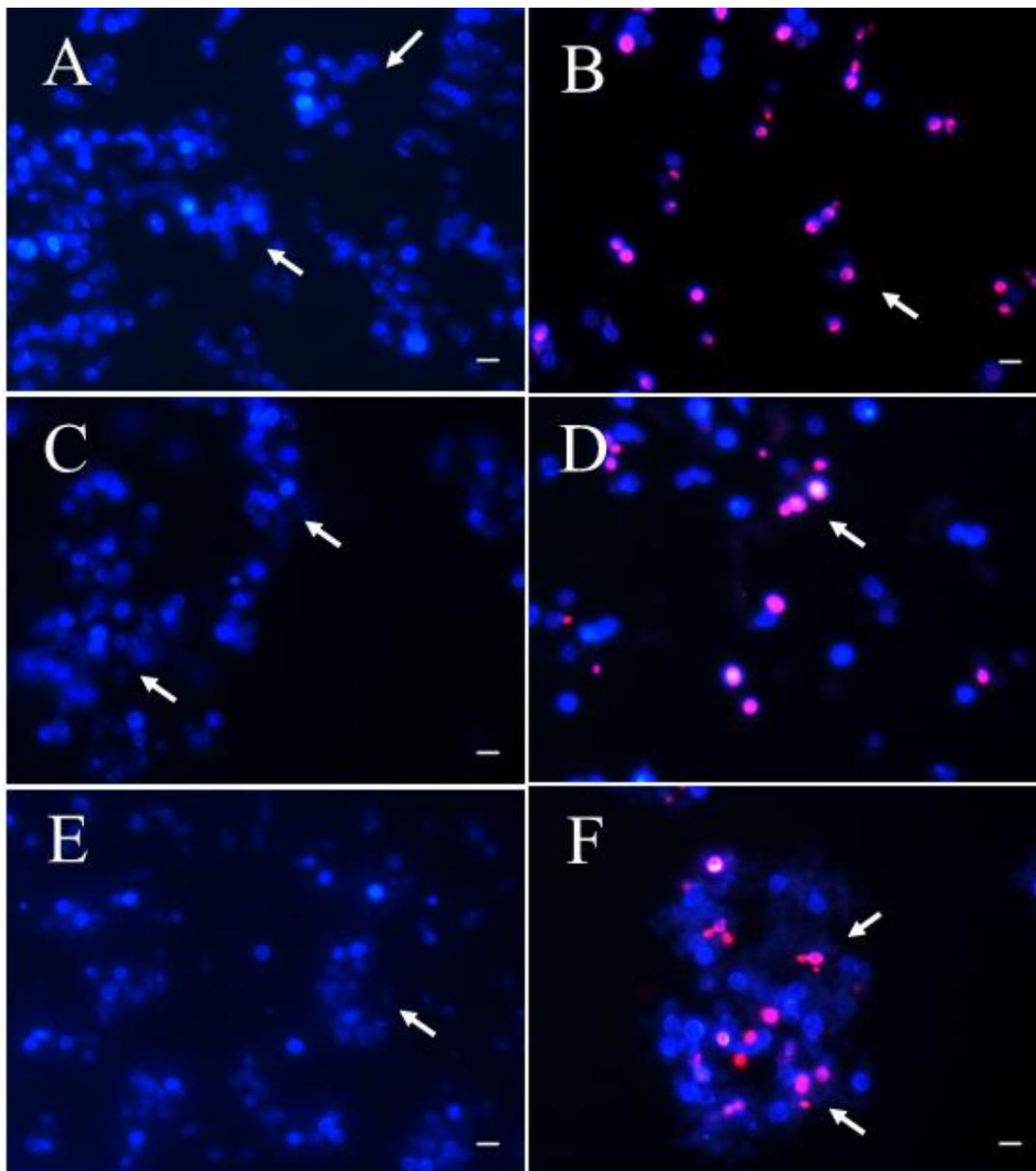


Figura 14. Micrografías obtenidas por microscopía de fluorescencia de los tratamientos con el EEP en las tres especies de Candida a las 48 horas. A) *C. albicans* sin tratamiento; B) *C. albicans* con tratamiento (2.5mg/mL); C) *C. lusitaniae* sin tratamiento; D) *C.lusitaniae* con tratamiento (5 mg/mL); E) *C. tropicalis* sin tratamiento; F) *C.tropicalis* con tratamiento (5 mg/mL). Barra 10  $\mu$ m.

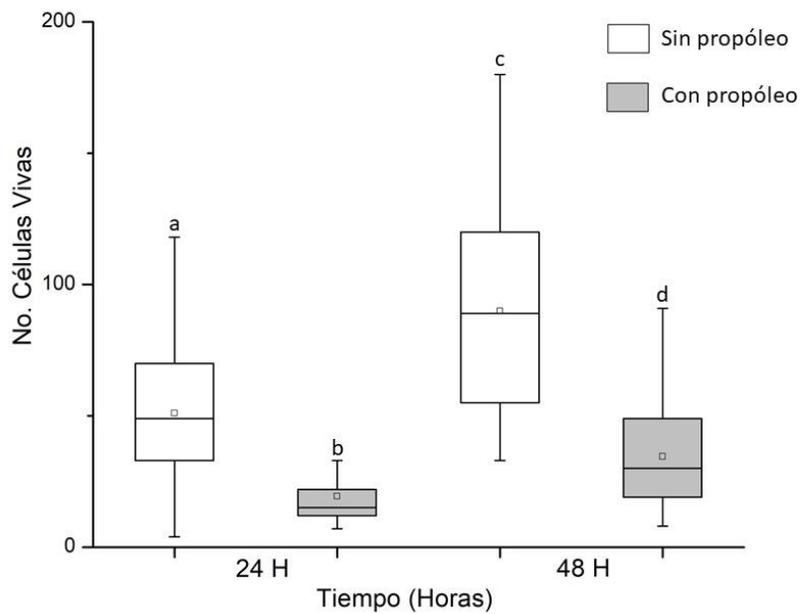


Figura 15. Efecto del EEP sobre *C. albicans* a diferentes tiempos. Literales distintas representan diferencias significativas (Wilcoxon  $P < 0.01$ ).

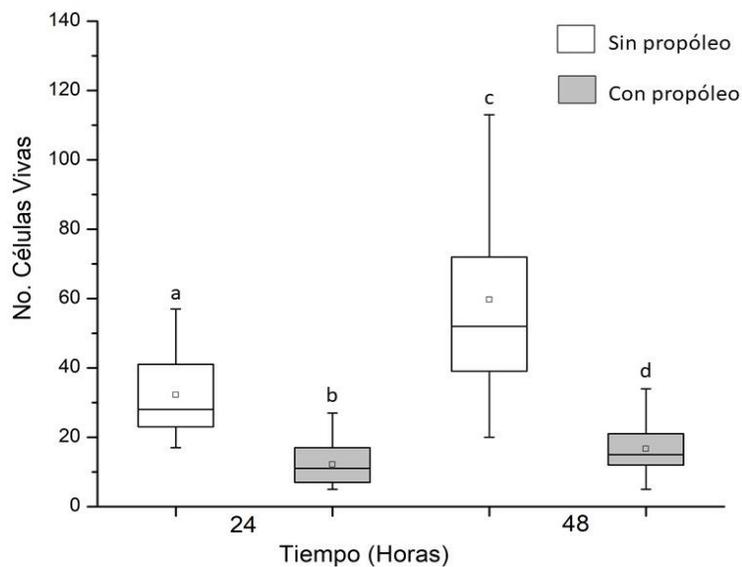


Figura 16. Efecto del EEP sobre *C. lusitaniae* a diferentes tiempos. Literales distintas representan diferencias significativas dentro del mismo tiempo de incubación (Wilcoxon  $P < 0.01$ ).

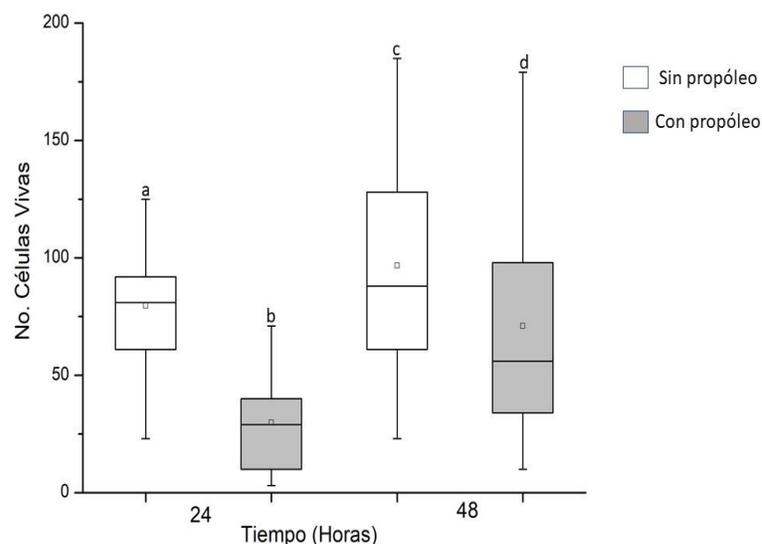


Figura 17. Efecto del EEP sobre *C.tropicalis*. Literales distintas representan diferencias significativas dentro del mismo tiempo de incubación (Wilcoxon  $P < 0.01$ ).

El EEP del estado de Morelos mostró actividad antifúngica contra las tres cepas clínicas de *Candida*, en los tres casos este efecto se observó a partir de las 24 horas, permaneciendo hasta las 48 horas, aunque para *C. albicans* y *C. tropicalis* disminuyó a las 48 horas, mientras que para *C. lusitaniae* se mantuvo. Porque se puede concluir que fue más efectivo contra esta última especie.

Con el trabajo realizado se demostró la efectividad como antifúngico del EEP del estado de Morelos, aunque para complementar su estudio se puede sugerir realizar un perfil químico para conocer con exactitud sus componentes y el porcentaje en que se encuentran, mediante técnicas de separación y purificación como la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), cromatografía en capa fina, cromatografía de gases, espectroscopia de masas y técnicas de resonancia.

## 9. Conclusiones

Se determinó el perfil químico del extracto etanólico del propóleo proveniente del estado de Morelos, México. Realizando pruebas químicas para identificar (cualitativas) y conocer la concentración (cuantitativas) de fenoles y flavonoides, compuestos que le otorgan actividad biológica, entre ellas la antimicrobiana.

El EEP del estado de Morelos, tuvo un efecto como antifúngico, al ser evaluado contra cepas clínicas de *C.albicans*, *C.lusitaniae* y *C.tropicalis*. Mediante la prueba de difusión en agar y la microtécnica de dilución en caldo, con la cual se determinó la CMI y CFM.

Se evaluó el daño que produce el EEP sobre la pared celular de las levaduras, mediante microscopía de fluorescencia, utilizando las tinciones de blanco de calcofluor y yoduro de propidio, mostrando un efecto antifúngico a partir de las 24 horas.

## 9. Bibliografía

1. Amalesh, S., Das, G., Kumar-Das, G. (2011) Roles of flavonoids in plants. *Int J Pharm Sci Tech.* 6(1), 12-22. Obtenido de:  
[https://www.researchgate.net/publication/279499208\\_Roles\\_of\\_flavonoids\\_in\\_Plants](https://www.researchgate.net/publication/279499208_Roles_of_flavonoids_in_Plants)
2. Amoros, M., Simões C. M. O., Girre L., Sauvager F., Cormier M. (1992). Synergistic Effect of Flavones and Flavonols Against Herpes Simplex Virus Type 1 in Cell Culture. Comparison with the Antiviral Activity of Propolis. *J Nat Prod*, 1, 55(12), 1732–40. Obtenido de:  
<https://doi.org/10.1021/np50090a003>
3. Azmi, M. G. & Tamer, A. (2014) What Makes Oral Candidiasis Recurrent Infection? A Clinical View. *Journal of Mycology*, Obtenido de: <https://doi.org/10.1155/2014/758394>.
4. Biasoli, M. (2013). Candidiasis. Centro de Referencia Micológica (COREMIC). Obtenido de: <http://www.fbioyf.unr.edu.ar/evirtual/file.php/118/>.
5. Bonifaz, Alexandro. (2015) *Micología médica básica*. Quinta edición. McGraw-Hill.
6. Bucio, C. M., Navarro-López F.A., Martínez, J., Torres-Morales, J.J., García-Aguilera E. (2016). Producción de propóleo en campo, recolectado por las abejas productoras de miel (*Apis mellifera*). *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 17(12), 515-522.
7. Cararach-Tur, M., Comino-Delgado, R., Armengol, E.D., Marimon-García, M., Martínez, J.C., Palacios-Gil-Antunáno, S., Torres-Rodríguez, J. (2013). La vulvovaginitis candidiasica recurrente. *Progresos de Obstetricia y Ginecología*, 56(2), 108—116. Obtenido de: <http://www.elsevier.es> el 01/09/2016.
8. Carrillo, M.L., Castillo, L.N., Mauricio, R. (2011). Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de Extractos de Propóleos de la Huasteca Potosina (México) *Información Tecnológica*, 22(5), 21-28. doi: 10.4067/S0718-07642011000500004.
9. Castrillón-Rivera, L.E., Palma-Ramos, A., Padilla-Desgarenes, M.C. (2013). Biopelículas fúngicas. *Dermatología Revista Mexicana*, 57(5), 350-361.
10. Huang, S., Zhang, C.-P., Wang, K., Li, G.Q., Hu, F.-L. (2014) Recent Advances in the Chemical Composition of Propolis. *Molecules*, 19(1), 19610-19632.

11. Kalogeropoulos, N., Konteles, S., Troullidou, E., Mourtzinou, I. & Karathanos, V. (2009). Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. *Food Chemistry*, 116, 452-461.
12. Katzung, B. (2013) *Farmacología básica y clínica*. Décima edición. McGraw-Hill.
13. Kujumgiev, A., Tsvetkova, I., Serkedjieva-Yu, Bankova, V., Christov, R., Popov, S. (1999). Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *Journal Ethnopharmacology*, 64, 235-240.
14. Londoño-Orozco, A. (2010). Estudio comparativo de la actividad antifúngica de un extracto de propóleo mexicano y de tres plantas que *Apis mellifera* usa para su producción. Doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.
15. Londoño-Orozco, A., Penieres-Carrillo, J. G., García-Tovar, C. G., Carrillo, L., Quintero-Mora, M. L., García-Vázquez, S.E., Mendoza-Saavedra, M. A., Cruz-Sánchez, 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(1), 49-55.
16. Lotti, C., Campo-Fernandez, A. L., Piccinelli, O., Cuesta-Rubio, I., Márquez-Hernández, Rastrelli, L. (2010). Chemical constituents of red mexican propolis, *Journal Agricultural Food Chemistry*, 58(4), 2209-2213.
17. Miguel, M.G., Nunes, S., Dandlen, S. A., Cavaco, A. M., Antunes, M. D. (2014) Phenols, flavonoids and antioxidant activity of aqueous and methanolic extracts of propolis (*Apis mellifera*) from Algarve, South Portugal. *Food Sci. Technol*, 34(1): 16-23.
18. Montalvo, C. E. (2010). Microscopía. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina.
19. Muñoz, J.A.M., Ramos-Escudero, D.F., Alvarado-Ortiz, C., Castañeda, C.B. (2007). Evaluación de la capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos en recursos vegetales promisorios. *Rev. Soc. Perú*, 73(3), 142-149.
20. Murillo, M. N. (2016). Técnicas de tinción histológicas. Universidad de Guadalajara.
21. Noriega-Salmón, Vanesa. (2014). El propóleo, otro recurso terapéutico. Universidad de Cantabria. Obtenido de: <https://repositorio.unican.es/bitstream/handle/10902/5580/NoriegaS>
22. Norma Oficial Mexicana NOM-003-SAG/GAN-2017, Propóleos, producción y especificaciones para su procesamiento.

23. Perea, E.J (2010). Infecciones del aparato genital femenino: vaginitis, vaginosis y cervicitis. *Medicine*, 10(57), 391-401.
24. Quintero-Mora M.L, Londono-Orozco A, Hernandez-Hernandez F, Manzano-Gayosso P, Lopez-Martinez R, Soto-Zarate CI, et al. (2008). Effect of Mexican propolis extracts from *Apis mellifera* on *Candida albicans* in vitro growth. *Revista Iberoamericana de Micología*, 25(1), 22-6.
25. Ramos, A. F & Miranda, J. L. (2016) Propóleos: una revisión de sus acciones antiinflamatorias y curativas. *Revista de Investigación Científica de Apiterapia Clínica*, 5(1). 51-62.
26. Ramos, L. (2006). Empleo de blanco de calcoflúor para el estudio de las especies de *Malassezia* por microscopía directa. *Revista Argentina de Microbiología* 38(4), 213-222.
27. Rivera-Yañez, C. R., Terrazas, L. I., Jimenez-Estrada, M., Campos, J. E., Flores-Ortiz, C. M., Hernandez, L. B., ... Canales-Martinez, M. M. (2017). Anti-Candida Activity of *Bursera morelensis* Ramirez Essential Oil and Two Compounds,  $\alpha$ -Pinene and  $\gamma$ -Terpinene-An In Vitro Study. *Molecules* (Basel, Switzerland), 22(12). <https://doi.org/10.3390/molecules22122095>
28. Salamanca-Grosso, G. (2017). Origen, naturaleza, propiedades fisicoquímicas y valor terapéutico del propóleo. Ibagué: Universidad de Tolima. 285-291.
29. Siegel, S. (1991). Estadística no paramétrica. Tercera edición. Trillas.
30. Taiz, L. & Zeiger, E. (2016) Fisiología vegetal. Tercera edición. Jaume. 314-317.
31. Toreti, V.C., Sato, H.H., Pastore, G.M., Parque, Y.K. (2013). Recent progress of propolis for its biological and chemicals compositions and its botanical origin. *Evid Based Complement Alternat Med*. Obtenido de: <https://vpnuc.unican.es/pubmed/.Danainfo=www.ncbi.nlm.nih.gov+23737843>
32. Vargas, A.C., Loguercio, A.P., Witt, N.M., da Costa, M.M., Silva, M., Viana, V. (2013). Atividade antimicrobiana "in vitro" de extracto etanólico de própolis, *Ciencia Rural*, 34(1), 159-163.
33. Velasquez, B.M & Montenegro, S.P. (2017) Actividad antimicrobiana de extractos etanólicos de propóleos obtenidos de abejas *Apis mellifera*. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*. (8)1, 185-193.

34. Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y., Fernández-López, J., Pérez-Álvarez, J.A., (2008). Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. *J. Food Sci.* 73, 117–124. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2008.00966.x>
35. Yang, T., Deqing, W., Yuanliang, H., Yee, H., Yun, Y., Deyun, W. (2014) The Immunological Enhancement Activity of Propolis Flavonoids Liposome In Vitro and In Vivo. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. Obtenido de: <https://doi.org/10.1155/2014/483513>.
36. Zhang, CH., Wang, K., Li, G., Liang Hu, F. (2014) Recent Advances in the Chemical Composition of Propolis. *Molecules*, 19, 19610-19632. doi:10.3390/molecules191219610