



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

UNIDAD DE BIOTECNOLGÍA Y PROTOTIPOS

**EL PROPÓLEO DE CHIHUAHUA INHIBE EL
CRECIMIENTO DE ESPECIES DE *Candida*.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
BIÓLOGA

PRESENTA:

CRUZ HERNÁNDEZ PAOLA BEATRIZ

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Ma. Margarita Canales Martínez

Los Reyes Iztacala, Tlalnepanitla, Edo. de Mex., 2020



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 Iztacala.

Fue dirigido por la Doctora María Margarita Canales Martínez.

Fue revisado por el siguiente jurado:

Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monroy

Dra. Ana Bertha Hernández Hernández

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 IN 212317

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM, por darme los mejores 4 años de mi vida, permitirme llenarme de tantos conocimientos con buenos profesores.

A la FESI, porque conocí a mis mejores amigos y amigas, permitirme conocer mi vocación y a quien debo mi desarrollo.

A la Dra. Ma. Margarita Canales Martínez, sin usted no lo hubiera logrado, gracias por tanto apoyo, por su comprensión, por las enseñanzas constantes, por meterme presión para que me apurara, porque siempre me animó. Pero sobre todo gracias por darme una oportunidad para trabajar con usted y su equipo que es el mejor y también por todo el cariño.

Al Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monroy, por el apoyo brindado para la realización de este proyecto.

A la Dra. Ana Bertha Hernández Hernández, por su apoyo tan incondicional, llevarme de la mano en cada momento, todas las enseñanzas que me dio, su paciencia, su tiempo, su dedicación, es algo que nunca voy a olvidar. Es una parte importante de este proyecto, gracias doctora

A la M. en C. Karla Stephanie Martínez Elizalde por las observaciones en mi trabajo

Al M. en C. Luis Barbo Hernández Portilla por la ayuda y observaciones brindadas.

Al equipo de Farmacognosia, Paola (mezquite), David, Juan polen, Karla, por sus consejos, enseñanzas, apoyo y tiempo. Gracias por ser tan buenos conmigo

Al Biólogo Uriel Nava Solís por tus consejos, ayuda, tiempo y por los momentos de chisme y Bullying a mi persona, en verdad gracias por las risas y toda la ayuda brindada.

A todos mis maestros y doctores que durante 4 años me alentaron, apoyaron y compartieron todos sus conocimientos.

DEDICATORIAS

Esta tesis está dedicada a mi padre, este es el momento por el cual tanto luché y quería que estuvieras presente. Pero, en fin, gracias por todo tu apoyo, las enseñanzas, por confiar tanto en mí, cuando yo dejé de hacerlo, aunque me sigues haciendo tanto falta y quisiera tenerte a mi lado a este logro que sin dudas es gracias a ti, sé que desde el cielo estás muy orgulloso de mi, tú fuiste quien me enseñó que el mejor conocimiento que se puede tener es el que se aprende por sí mismo.

También está dedicado a mi madre, gracias por haber sido mi apoyo en toda mi carrera universitaria, por confiar en mí y alentarme cada día a ser mejor, te debo mucha mami y por fin tanto esfuerzo rindió frutos, gracias mami por enseñarme que incluso la tarea más grande se puede lograr si se hace un paso a la vez.

A mis hermanos Iván y Lili por su cariño y apoyo, durante todo este proceso, por estar conmigo en todo momento gracias. A toda mi familia porque con sus oraciones, consejos y palabras de aliento hicieron de mí una mejor persona y de una u otra forma me acompañan en todos mis sueños y metas.

A Alba Carreño y Dalia, gracias por todo su apoyo incondicional, alentarme tanto, cuando me daba por vencida y siempre ser tan buenas conmigo, son un pilar importante en mi vida.

A Omar Ojeda por regalarme mi primer Laptop y apoyarme tanto en mi carrera universitaria. Por sus buenos consejos y momentos llenos de risas.

A mi gran amor Abner, a ti te debo mucho y no alcanzan las palabras para agradecerte todo lo que haces por mí, estuviste desde el primer momento de mi travesía universitaria, siempre me apoyas, me alientas siempre a ser una mejor persona, y lo intento, quiero que estés conmigo para que lo veas, me escuchas, me aconsejas, eres el pilar más importante de mi vida y de este logro. Te amo muchísimo, más aventuras nos aguardan.

A Oscar, Daniela y Alejandra, por su valiosa amistad, su apoyo, por todas las risas y por todas las veces que me escucharon y no dejaron que me rindiera. Por ser también una inspiración para completar mis metas. Los quiero amigos.

A mis amigos de LICyT, Ernesto, Fer, Boni, Cristal y Stef, por tantas risas, sobre todo a Ernesto y Stef por compartir todos sus conocimientos conmigo, por su paciencia y por su valiosísima amistad, también por todas las tardes llenas de risas y chismes. Los quiero chicos

A mis amigos Roberto, Luis Fernando, Misa y Efraín, gracias por hacerme reír tanto, por su valiosa amistad, aunque me hacían mucho Bull ying, los quiero chicos, jamás los voy a olvidar.

A mis amigas América, Mariana, Ivonns, Maricela, Grecia, Lucero, Martha, Valeria y Karlita chicas fueron lo mejor de la universidad, gracias por todo su apoyo, por

todos los momentos de risas, sobre todo Mary, Ivonns y América, el Bull ying en gran parte hacia mí, ustedes siempre me alentaron a seguir adelante. Con ustedes que compartí muchas cosas dentro y fuera de las aulas. Ahora se convierten en amigos de vida y mis colegas, gracias por todo su apoyo y diversión. Las quiero mucho.

Contenido

I. RESUMEN	10
II. INTRODUCCIÓN.....	12
1. MICOSIS	12
1.1 Clasificación	12
1.2 Hongos.....	12
2 CANDIDIASIS.....	13
2.1 Mecanismos Patogénicos	13
2.2 Inmunidad Innata y <i>Candida</i>	14
2.3 Evasión De La Respuesta Inmune Por Parte De <i>Candida</i>	14
3. EPIDEMIOLOGÍA Y ETIOLOGÍA.....	15
4. MEDICINA TRADICIONAL	17
4.1 Apiterapia	17
4.2 Propóleo	17
III. ANTECEDENTES	19
IV. JUSTIFICACIÓN	21
V. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	21
VI. HIPOTESIS	21
VII. OBJETIVOS.....	22
OBJETIVOS PARTICULARES	22
VIII. MATERIALES Y METODOS.....	22
1. Características organolépticas	22
2. Obtención de los extractos.....	23
3. Evaluación cualitativa.....	24
4. Evaluación cuantitativa	24
5. Evaluación de la actividad fungistática o fungicida	25
6. Capacidad antioxidante.....	25
7. Composición química.....	25
8. Cuantificación de fenoles totales	27
9. Cuantificación de flavonoides totales	27
IX. RESULTADOS	28
11.1 Características organolépticas	28
a. Rendimiento del propóleo	28

11.2 Pruebas cualitativas de la actividad antifúngica	29
X. PRUEBAS CUANTITATIVAS	31
12 Actividad del extracto metanólico del propóleo sobre la curva de crecimiento de levaduras.....	32
13. Capacidad antioxidante, fenoles y flavonoides	36
14. Composición química	38
14.1 Cromatografía Líquida De Alta Resolución (HPLC)	38
14.2 Cromatografía Líquida De Alta Resolución Acoplada A Espectrometría De Masas (HPLC-Ms).....	42
14.3 Cromatografía De Gases Acoplada A Espectrometría De Masas (Gc-Ms).....	45
XI. DISCUSIÓN	50
XII. CONCLUSIÓN.....	57
REFERENCIAS.....	58

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO 1: Frecuencia de especies patógenas de <i>Candida</i>	13
CUADRO 2: Parámetros para determinar características organolépticas de los propóleos	18
CUADRO 3: Características organolépticas para el propóleo de Chihuahua.	22
CUADRO 4: Rendimientos de los extractos obtenidos del propóleo de Chihuahua.	23
CUADRO 5: Actividad antifúngica del propóleo.	24
CUADRO 6: Concentración fungicida media (CF50) y concentración fungicida mínima (CFM) del extracto metanólico del propóleo.	26
CUADRO 7: Concentración de fenoles, flavonoides y capacidad antioxidante.	31
CUADRO 8: Compuestos detectados en la cromatografía líquida de alta resolución del extracto metanólico a 254 nm.	33
CUADRO 9: Compuestos presentes en el extracto metanólico de propóleo, detectados en el HPLC-MS.	37
CUADRO 10: Compuestos identificados de la Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas del extracto hexánico del propóleo.	38
CUADRO 11: Compuestos identificados de la Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas del extracto clorofórmico del propóleo.	41

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: Obtención de los extractos de diferente polaridad.	19
FIGURA 2: Destilación del extracto clorofórmico, en el rotavapor.	19
FIGURA 3: Sensibilidad de cada cepa de <i>Candida</i> frente a los diferentes extractos de un propóleo de Chihuahua.	25
FIGURA 4: Actividad del extracto metanólico del propóleo sobre curva de crecimiento de <i>Candida Albicans</i> ¹ (caso clínico).	27
FIGURA 5: Actividad del extracto metanólico del propóleo sobre curva de crecimiento de <i>Candida albicans</i> ¹¹ caso clínico.	
FIGURA 6: Actividad del extracto metanólico del propóleo sobre curva de crecimiento de <i>Candida glabrata</i> ¹⁷ caso clínico.	29
FIGURA 7: Actividad del extracto metanólico del propóleo sobre curva de crecimiento de <i>Candida tropicalis</i> ¹⁸ caso clínico.	29
FIGURA 8: Cromatograma de la cromatografía líquida de alta resolución del extracto metanólico de propóleo a 254 nm.	32
FIGURA 9: Cromatograma de la Cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplada a Espectrometría de Masas del extracto metanólico del propóleo.	36
FIGURA 10: Cromatograma de la Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas del extracto clorofórmico del propóleo.	40

I. RESUMEN

El propóleo es una sustancia resinosa recolectada por las abejas (*Apis mellifera*), a partir de diferentes plantas. Sus propiedades medicinales, han llamado la atención de diferentes investigadores a través de los años, ya que posee actividad antifúngica antibacteriana entre otras, mostrando variación en su actividad biológica, debido a su origen geográfico. En México la información sobre la actividad de este producto es muy limitada. El objetivo de este trabajo fue verificar si uno de los productos de las abejas, el cual tiene un origen natural y con gran actividad biológica, puede ser una alternativa a los agentes antifúngicos.

Se obtuvieron tres extractos (metanólico, clorofórmico y hexánico) del propóleo de Chihuahua, agregando los solventes de menor a mayor polaridad, el exceso de solvente se destiló por medio de presión reducida, empleando el rotavapor. Se realizaron pruebas cualitativas con 16 cepas de hongos levaduriformes (*Candida*). Las levaduras mostraron sensibilidad a los extractos clorofórmico y metanólico, el hexánico por su parte, no tuvo actividad debido a que disuelve otros compuestos como ceras y lípidos.

Se determinó la CFM, CF₅₀ y CF₂₅, por el método de dilución en caldo, se realizaron curvas de crecimiento con diferentes concentraciones del extracto metanólico del propóleo; además se determinó si el efecto era fungicida o fungistático. El extracto metanólico demostró una actividad fungicida para 2 cepas de *C. albicans* (caso clínico) y en las primeras horas de crecimiento con una CFM de 1.25 mg/mL y con CF₅₀ de 0.625 mg/mL. Para el caso de una cepa de *C. glabrata* (caso clínico) no obtuvo efecto fungicida, sin embargo, siempre se mantuvo por debajo del grupo testigo. Para *C. tropicalis*, se alcanzó el efecto fungicida a las 6 horas con la CFM 1.25 mg/mL. Se obtuvo también la capacidad antioxidante y el extracto metanólico presentó una fuerte capacidad antioxidante.

Se cuantificaron los fenoles totales, donde el extracto metanólico presentó 430 mg (e AG) /g, mientras que el clorofórmico presentó 21.94 mg (e AG) /g. Con la cuantificación de flavonoides el extracto metanólico presentó 15.51 mg (e Q) /g y el clorofórmico 18.06 mg (e Q) /g. Se realizó un perfil químico del extracto clorofórmico, hexánico y metanólico. Por HPLC, del extracto metanólico se encontraron principalmente fenoles (flavonoides, ácidos fenólicos y sus ésteres). Para el extracto metanólico, por medio de HPLC-MS, se detectaron los principales flavonoides como: luteolina, naringenina, kaemferol, pinocembrina, crisina y apigenina. A los compuestos fenólicos se les atribuye la actividad biológica de los propóleos. Finalmente, para GC-MS de los extractos hexánico y clorofórmico, se detectaron polioles, ácidos y otros hidrocarburos. Entre los ácidos se identificaron ácidos

carboxílicos como el ácido palmítico, el ácido eicosanóico y el ácido oleico, a los que se les atribuye diferentes actividades biológicas.

PALABRAS CLAVE: Propóleo, antifúngico, fungicida, antioxidante, fenoles, flavonoides.

II. INTRODUCCIÓN

1. MICOSIS

La micosis agrupa una serie de enfermedades muy variadas en cuanto a su manifestación clínica, que se encuentra producida por hongos, tanto miceliales como unicelulares (levaduras). Estos microorganismos tienen alta distribución en el ambiente y por lo tanto una erradicación casi imposible. Algunos casos de micosis son afecciones oportunistas provocados ante la baja de defensas del sistema inmune del sujeto afectado. Tal baja puede ser causada por estrés, estados psíquicos de ansiedad o depresión, por el retrovirus del VIH-Sida o por ciertos tratamientos quimioterápicos, entre otros factores (Blanco y García, 2000).

1.1 Clasificación

Las infecciones micóticas se pueden clasificar en tres tipos, de acuerdo con los tejidos que son colonizados, inicialmente:

- **MICOSIS SUPERFICIALES:** Son causadas por hongos que se limitan a las capas más externas de piel, pelo y pezuñas. Como atacan a nivel del estrato córneo, no hay respuesta inmune y no hay producción de anticuerpos, ya que los agentes etiológicos, no atravesarán más de esta capa y producirán una respuesta.
- **MICOSIS SUBCUTÁNEAS O INTERMEDIAS:** Estas infecciones afectan la dermis, los tejidos subcutáneos, el músculo y la fascia. Son un grupo heterogéneo de enfermedades en las que la implicación traumática del agente fúngico induce lesiones dérmicas o subcutáneas de evolución lenta. Puede haber una extensión del hueso contiguo, con la consiguiente producción de osteomielitis. Algunas enfermedades, se extienden a lo largo de la cadena linfática, sin embargo, las micosis subcutáneas se hacen sistémicas sólo en escasas oportunidades.
- **MICOSIS PROFUNDAS O SISTÉMICAS:** Afectan capas más profundas de la epidermis, también los pelos y las uñas. Diferentes hongos se encuentran habitualmente en el medio ambiente por lo que van a necesitar de la concurrencia de factores (como es la pobre defensa inmunitaria) para que se establezca la infección micótica, siendo las principales puertas de entrada el aparato respiratorio y el tracto digestivo (Pérez y Carrasco, 2000).

1.2 Hongos

Los hongos son organismos eucarióticos, caracterizados por la formación de hifas, que son estructuras filamentosas constituidas por una sucesión de células

intercomunicadas, que en conjunto constituyen el micelio, estas estructuras representan la forma invasiva de los hongos patógenos. Sin embargo, un grupo importante de hongos patógenos, no producen hifas y se caracterizan por presentar únicamente estructuras unicelulares (levaduras). Los hongos desarrollan un papel fundamental en el mantenimiento de la biosfera, también contienen muchos metabolitos secundarios de interés en medicina y en biotecnología, como aspecto negativo, presentan un número importante de enfermedades en el hombre y en los animales (Gadea et al., 2007)

La clasificación de los hongos se ha basado tradicionalmente en la morfología de sus estructuras fértiles. En la actualidad el reino Fungi, se divide en dos subreinos Dykaria, el cual agrupa las divisiones Ascomycota y Basidiomycota, y el de los Hongos basales, que agrupa al resto de los hongos (Gadea et al., 2007)

A la división Ascomycota pertenecen la mayoría de los hongos patógenos, tanto levaduriformes como los filamentosos. Entre los levaduriformes cabe destacar en los últimos años el incremento espectacular de las infecciones por *Candida* (*Saccharomycetales*). Es relevante el incremento significativo de infecciones por otras especies diferentes de *Candida albicans*, especialmente por *Candida glabrata*, seguida de *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* y *Candida krusei* (Boekhout et al., 2009).

2 CANDIDIASIS

La candidiasis es una infección común de la piel, la cavidad oral y el esófago, el tracto gastrointestinal, la vagina y el sistema vascular de los seres humanos. Aunque la mayoría de las infecciones se presentan en pacientes inmunodeprimidos o debilitados, el principal organismo responsable de la enfermedad es *Candida albicans*, que expresa varios factores de virulencia que contribuyen a la patogénesis.

2.1 Mecanismos Patogénicos

1. ADHERENCIA: Es un mecanismo multifactorial en el que, utilizando varios tipos de adhesinas dependientes de su estado morfológico, las especies de *Candida spp.* modifican su adherencia a distintas superficies. La máxima expresión de adherencia de esta levadura es la formación de biopelículas en el hospedero.
2. DIMORFISMO (MORFOGÉNESIS): Se define como la transición de la forma levaduriforme unicelular, a la forma filamentosa (pseudohifas o hifas).
3. Invasión: La secreción de proteinasas es fundamental para degradar las barreras del tejido y obtener nutrientes en el sitio de infección (Alburquenque y Tapia 2013).

2.2 Inmunidad Innata y *Candida*

Los tipos celulares que participan en la inmunidad innata frente a *Candida*, son las células epiteliales y las células fagocíticas (polimorfonucleares neutrófilos, monocitos-macrófagos y células dendríticas). En el reclutamiento y activación de estas últimas, participan diversas citoquinas proinflamatorias y además hay factores solubles involucrados como el sistema de complemento y anticuerpos (Alburquenque y Tapia 2013).

2.3 Evasión De La Respuesta Inmune Por Parte De *Candida*

En su estado comensal *C. albicans* debe sobrevivir al sistema defensivo del hospedero, al pH local y debe adquirir nutrientes y además competir con otros microorganismos de la microbiota.

1. Transición de fase de levadura a hifa: *C. albicans* es considerado por muchos un hongo dimórfico, en el sentido que puede pasar de un hongo levaduriforme a hifa.
2. Invasión de epitelios: *C. albicans* invade la barrera epitelial a través de dos mecanismos diferentes:
 - 2.1 Invasión tisular activa inducida: En este mecanismo, las hifas ingresan a las células epiteliales invadiendo el tejido.
 - 2.2 Endocitosis pasiva inducida: Por otra parte, se sabe que *C. albicans* simula la función de las caderinas del hospedero induciendo una endocitosis a través de su unión a E-caderina de las células epiteliales orales.
3. Escape de la fagocitosis:
 - 3.1 Inhibición y degradación del complemento: *C. albicans* posee varias estrategias para interferir con la activación del complemento, con el fin de evitar la fagocitosis o para reducir la producción de citoquinas proinflamatorias.
 - 3.2 Inhibición de la formación del fagolisosoma: Un importante paso en el proceso de eliminar a un patógeno es la fusión del fagosoma que contiene el microorganismo con los lisosomas. *C. albicans* es capaz de modular el tráfico de membranas intracelulares inhibiendo la formación del fagolisosoma.
 - 3.3 Inhibición de especies reactivas de oxígeno (ROS): La producción de ROS es el mayor mecanismo antifúngico en los fagocitos. Para contrarrestar el estrés oxidativo *Candida* posee varios mecanismos defensivos como la activación de catalasas (CAT) y superóxido dismutasas (SOD) de superficie. Aunque el reconocimiento de la pared celular de *C. albicans* es necesario para la producción de ROS, se requiere viabilidad de *C. albicans* para neutralizarlos. Se

sabe que además la capacidad de *C. albicans* de generar vacuolas, le confiere resistencia al estrés oxidativo y favorece el crecimiento como hifas.

4. Modulación de la producción de citoquinas por factores solubles: Aunque se conoce mucho de los mecanismos por los cuales *C. albicans* induce la producción de citoquinas en el hospedero, el como esta levadura explota la producción de citoquinas para su propio beneficio, ha sido poco explorado (Cheng, 2012).

Las especies de *Candida* son una fuente común de infecciones. La prevalencia de infecciones por *Candida* ha aumentado considerablemente en la última década, y se ha convertido en una grave amenaza para los pacientes de alto riesgo (por ejemplo, pacientes infectados por el VIH, pacientes de oncología, pacientes pediátricos, pacientes de trasplante, neonatos, mujeres con vaginitis recurrente, pacientes con diabetes, y pacientes con enfermedades crónicas postrados en cama). El aumento de infecciones por *Candida* ha visto un aumento, la mortalidad bruta es de aproximadamente el 35%, con los valores más altos observados en los ancianos, los que padecían fungemia de *C. tropicalis* y los pacientes con tumores sólidos (Boekhout et al., 2009).

Las candidiasis invasoras están relacionadas principalmente con enfermos quirúrgicos, pacientes ingresados en unidades de cuidados intensivos, personas infectadas por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o cualquier enfermo con una inmunosupresión importante, con catéteres o recibiendo alimentación parenteral. La mayoría de las candidiasis están producidas por la especie *Candida albicans* y el origen de la infección es mayoritariamente endógeno, al ser esta especie un componente de la microbiota oral, digestiva o vaginal de un 5 a 50% de las personas (Mejía et al., 2013)

3. EPIDEMIOLOGÍA Y ETIOLOGÍA

La epidemiología de la candidiasis ha mostrado cambios en las últimas décadas como consecuencia de las modificaciones ambientales, la distribución de los agentes etiológicos, el envejecimiento de la población, el aumento de las terapias inmunosupresoras y de enfermedades como el VIH, además del uso indiscriminado de agentes anti fúngicos, lo cual se refleja en cambios en los patrones clínicos (Criado et al., 2011).

Candida spp. producen un amplio espectro de enfermedades, que van desde enfermedades mucocutáneas superficiales hasta enfermedades invasivas (Fidel et al., 1999).

CUADRO 1: Frecuencia de especies patógenas de *Candida*. (Tomado de Vázquez y Sobel 2011)

ESPECIES	FRECUENCIA
<i>C. albicans</i>	50%
<i>C. tropicalis</i>	15-30%
<i>C. parapsilosis</i>	15-30%
<i>C. glabrata</i>	15-30%
<i>C. krusei</i>	~1%
<i>C. guilliermondii</i>	~1%
<i>C. lusitaniae</i>	~1%
<i>C. dubliniensis</i>	~1%

Se han reportado más de 17 especies patógenas, el 90% de las infecciones se atribuyen a: *C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*. (Fidel et al., 1999).

Las candidiasis superficiales son frecuentes, de fácil tratamiento y no atentan contra la vida del paciente, en tanto que las sistémicas de evolución aguda o crónica son generalmente graves. La mayoría de estas infecciones se originan de un foco endógeno (tracto gastrointestinal o respiratorio) aunque no se descarta la participación de fuentes externas. La distribución geográfica de esta micosis es universal y más de 70 % de ellas son producidas por *C. albicans* observándose un porcentaje mayor por el serotipo B. Los casos de candidiasis sistémica están relacionados a pacientes con severas deficiencias en su sistema inmune.

C. krusei y *C. glabrata* son habitualmente resistentes a los compuestos azólicos y su hallazgo como agentes infecciosos involucrados en enfermedades sistémicas intrahospitalarias ha aumentado en los últimos años. Los casos registrados de candidiasis muestran que el sexo no influye en la frecuencia, a excepción de la candidiasis urogenital que tiene mayor incidencia en el sexo femenino (Fidel et., 1999).

Las infecciones invasivas por hongos siguen siendo una causa importante de morbilidad y mortalidad en pacientes que reciben trasplantes y en aquellos que presentan inmunocompromiso. Este aspecto se explica en gran parte por el desarrollo de mecanismos de resistencia primaria y secundaria a los antimicóticos entre algunas especies de hongos, seguido de la problemática en la administración inadecuada de medicamentos fungistáticos que al prolongar el tratamiento por largos periodos de tiempo permiten la selección de clones resistentes (Alzate, et al., 2009).

4. MEDICINA TRADICIONAL

La medicina tradicional es una realidad presente en todo el mundo, forma parte del patrimonio cultural de cada país y emplea prácticas que se han transmitido de una generación a otra desde centenares de años antes del desarrollo de nuestra medicina actual (Morón y Jardines, 1997). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, la medicina tradicional es todo el conjunto de conocimientos, aptitudes y prácticas basados en teorías, creencias y experiencias indígenas de las diferentes culturas, sean o no explicables, usados para el mantenimiento de la salud, así como para la prevención, el diagnóstico, la mejora o el tratamiento de enfermedades físicas o mentales (OMS, 2000).

La medicina natural y tradicional, realidad presente en la práctica médica actual, comprende un grupo diverso de sistemas médicos para el cuidado de la salud, así como prácticas y productos que no son considerados como parte de la medicina convencional. Estas terapéuticas han mostrado un marcado incremento en cuanto a su conocimiento y utilización a nivel mundial y son numerosas las investigaciones realizadas que revisan este hecho (Ramírez et al., 2012).

4.1 Apiterapia

La apiterapia, el uso medicinal de los productos de la abeja *Apis mellifera*, se ha practicado desde la antigüedad, el polen, la miel, el propóleo, la jalea real y el veneno de abejas forman parte de ella (Carrillo, 2016).

4.2 Propóleo

El propóleo es una sustancia resinosa recolectada por las abejas (*Apis mellifera*) a partir de yemas, brotes y peciolos de las hojas de diferentes vegetales, y que mezclan en la colmena con ceras y secreciones salivales (Londoño et al., 2008).

Es usado como un protector natural contra microorganismos patógenos y hongos; protege contra el frío durante el invierno y actúa como material de sellado en las paredes externas e internas de la colmena para reducir la entrada de insectos (Vargas et al., 2013). Este producto es muy apreciado por sus actividades biológicas, antibacterianas, antiviral, antifúngicas, antioxidantes, cicatrizante; inmuno-estimulante, anestésica, analgésica y fitoinhibitoria. Estas características están relacionadas con su composición química, origen botánico, época de recolección y la especie de abeja recolectora (Manrique y Santana, 2008). A lo largo de los siglos, la humanidad se ha beneficiado del alto valor medicinal, funcional y económico de los propóleos recolectados en todo el mundo, que también tiene un valor cultural debido a su uso en rituales de momificación por parte de los antiguos

egipcios (Tobaldini, et al., 2016). Al igual que la cultura griega, romana, maya e inca. Durante los últimos 30 años se ha retomado su uso en diversos países como Argentina, Brasil, China, Japón y México para el tratamiento de diversos padecimientos (Vargas et al., 2013).

Los egipcios apreciaban sus propiedades anti putrefactivas y lo utilizaban para embalsamar cadáveres; los médicos árabes lo empleaban como antiséptico y cicatrizante de heridas y como un desinfectante para la boca; los soldados del imperio romano llevaban propóleos como un medicamento de emergencia para sanar heridas de guerra. Estas aplicaciones se perpetuaron en la Edad Media como un remedio tradicional que se emplea frecuentemente en Europa Oriental y es bien conocido por su actividad antibacterial (Vargas et al., 2013).

Más de 300 compuestos químicos se han descrito en los propóleos de diversos orígenes, entre los que se hallan polifenoles, ácidos fenólicos y sus ésteres, aldehídos, alcoholes, cetonas, terpenoides, esteroides, aminoácidos y compuestos inorgánicos (Vargas et al., 2013). Sin embargo, la composición química de este producto apícola es altamente variable y depende de la flora local del sitio de recolección, tanto en brotes como en ramas, cortexas y flores (Kumazawa et al., 2004).

Dada su acción anti fúngica es una sustancia de gran potencial para ser empleada en el tratamiento de afecciones provocadas por diferentes microorganismos.

III. ANTECEDENTES

El propóleo tiene gran importancia médica, por lo tanto, en diversas partes del mundo ya se están realizando estudios, acerca de su composición química y la capacidad biológica.

- Tolosa y Cañizares en 2017, obtuvieron y caracterizaron extractos etanólicos y acuosos de propóleos de diferentes localidades del estado de Campeche, México, probando posteriormente su efectividad antimicrobiana sobre las bacterias *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Streptococcus pyogenes*. Los extractos presentaron colores que variaron del ámbar claro al café oscuro, encontrándose un rendimiento en sólidos solubles totales superior en los etanólicos que en los acuosos. Se identificaron como metabolitos: lactonas, saponinas, fenoles, triterpenos, taninos, alcaloides, flavonoides, sustancias aminadas y leucoantocianidinas, estas últimas sólo en los extractos acuosos. La efectividad antimicrobiana de los extractos depende del solvente empleado, la procedencia del propóleo y de la especie bacteriana evaluada, siendo los extractos etanólicos los más efectivos.
- En un estudio realizado por Joya et al. en 2017, determinaron la actividad fungistática y fungicida de propóleos venezolanos y de 3 regiones del mundo. En el estudio emplearon 4 propóleos comerciales al 60% (concentración final de 100mg/ mL) producido por abejas *Apis mellifera* de regiones geográficas de Alemania, España, Italia y Venezuela. En la preparación, de estos propóleos se usó como solvente etanol al 70%. Los propóleos de mayor actividad biológica fueron los de Alemania e Italia, seguidos por el de Venezuela y España. Concluyeron que los extractos etanólicos de propóleos tienen efectos fungistáticos y fungicidas sobre las especies de *C. albicans*, *C. krusei*, *C. guilliermondii* y *C. tropicalis*; que *C. tropicalis* es la especie más resistente a la acción biológica de propóleos y *C. krusei* y *C. guilliermondii* las más sensibles; que los propóleos de Alemania e Italia son los más efectivos contra las especies de *Candida* aisladas de pacientes venezolanas.
- Freires et al. en 2016, tuvieron como objetivo determinar la composición química y la actividad antifúngica de propóleos brasileños contra *Candida* spp. y sus efectos en la morfología de las biopelículas de *Candida* preformadas y maduras. Las muestras de propóleos recolectadas por *Apis mellifera* se obtuvieron de diferentes regiones de Brasil. Se prepararon extractos etanólicos de propóleos se fraccionaron y se sometieron a análisis químicos por GC/MS. Los extractos y sus fracciones de hexano,

diclorometano y acetato de etilo se probaron para determinar su capacidad para inhibir *Candida spp.* (*C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. kruzei*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis*) mediante la determinación de las concentraciones inhibitorias y fungicidas mínimas. El extracto etanólico y las fracciones fueron predominantemente agentes fungistáticos. Los tipos de propóleos tienen una fuerte actividad anticandida y deben considerarse como candidatos prometedores para tratar la candidiasis oral y sistémica.

- Por otro lado, García et al. en 2014, determinaron la efectividad de los extractos etanólicos comerciales en el estado de Mérida, para la eliminación de *Candida albicans* en muestras de resina acrílicas duras. Se probaron diferentes proporciones de los extractos etanólicos al 20%, 30% y 40%). Encontraron en un primer tiempo que en las cajas de Petri se presentó crecimiento de *C. albicans* solamente en el control; en segundo tiempo de difusión en agar, el extracto etanólico al 20% formó el halo de inhibición de menor tamaño, los extractos etanólicos al 30% y 40% produjeron halos inhibitorios de forma irregular. Los extractos etanólicos de propóleo al 20% mostraron una inhibición del crecimiento de *C. albicans* y al 30% y 40% tuvieron actividad anti fúngica de tipo fungicida frente a *C. albicans*
- Quintero et al. en 2008, evaluó la acción inhibitoria de un extracto etanólico al 15% de propóleo de la abeja *Apis mellifera*, procedente del apiario de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, sobre el crecimiento de *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, y *Aspergillus fumigatus*. Estos resultados sugieren al propóleo como un tratamiento alternativo contra las infecciones por hongos, tanto levaduriformes como filamentosos.
- Manrique en 2006, evaluó la actividad antimicrobiana de los propóleos venezolanos y la influencia estacional, todos los extractos etanólicos de propóleos estudiados mostraron actividad antimicrobiana, al inhibir el crecimiento del *Staphylococcus aureus* y del *Micrococcus luteus*. Los resultados sugieren que los propóleos estudiados muestran influencia estacional en la inhibición del crecimiento bacteriano y que los extractos etanólicos del propóleo pueden ser usados como agentes antimicrobianos contra *S. aureus* y *M. luteus*.

IV. JUSTIFICACIÓN

En México, la información respecto a la actividad del propóleo es muy limitada, y debido al aumento en la prevalencia de las micosis, la aparición de cepas fúngicas resistentes a los agentes antimicóticos empleados en la actualidad y los efectos secundarios que estos últimos provocan en los pacientes son, sin duda, algunos indicadores de la necesidad de encontrar o desarrollar nuevos compuestos que cumplan con los requerimientos de un antifúngico ideal (Schelz, et al., 2006) Entonces el propóleo puede vislumbrarse como potencial tratamiento contra las infecciones por hongos levaduriformes sobre la base del constante aumento de la prevalencia de las micosis, del desarrollo de resistencia a agentes antimicóticos actuales, de los efectos adversos que poseen estos antimicóticos y porque la terapia con propóleos resulta ser una excelente alternativa.

Por lo tanto, con el presente estudio de extractos hexánico, clorofórmico y metanólico de un propóleo de Chihuahua se pretende contribuir a la información sobre propóleos mexicanos acerca de la actividad biológica (Antifúngica) y su composición química.

V. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Los extractos hexánico, clorofórmico y metanólico de un propóleo de Chihuahua presentarán actividad antifúngica sobre especies de *Candida*?

VI. HIPOTESIS

El propóleo está formado por diversas partículas vegetales y su función natural es proteger a la colmena de bacterias y hongos; por lo tanto, los extractos hexánico, clorofórmico y metanólico de un propóleo de Chihuahua, probablemente tendrán actividad antifúngica *in vitro*, esto relacionado a sus componentes fitoquímicos.

IV. OBJETIVOS

- Evaluar la actividad antifúngica de un propóleo de Chihuahua sobre diferentes especies de *Candida*

Objetivos Particulares

1. Determinar la composición química de los extractos del propóleo de Chihuahua (hexánico, clorofórmico y metanólico) por una GC-MS, HPLC-DAD y HPLC-MS
2. Determinar la capacidad antioxidante por medio del radical DPPH y cuantificar los fenoles totales y flavonoides.
3. Determinar la actividad anti *Candida* con el ensayo de difusión en caldo.
4. Determinar la CF₅₀ y CFM.
5. Determinar la actividad fungistática o fungicida en una cinética de crecimiento.

V. MATERIALES Y METODOS

1. Características organolépticas

Las características organolépticas se determinaron, considerando las especificaciones de la Norma Mexicana de Propóleos 2017.

CUADRO 2: Parámetros para determinar características organolépticas de los propóleos (NMP, 2017).

PARÁMETROS

COLOR	rojo, amarillo-rojizo, amarillo-oscuro, verde, castaño, pardo, 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.

2. Obtención de los extractos

Para la obtención de los extractos hexánico, clorofórmico y metanólico se obtuvieron agregando los solventes de menor a mayor polaridad (Domínguez, 1973). El exceso de solvente se destiló por medio de presión reducida, empleando el rotavapor. El rotavapor es un aparato que, mediante destilación a vacío, permite la evaporación rápida de disolvente de una disolución recuperando el soluto (líquido o sólido) (Leiva, 2017). El extracto hexánico se colocó en el rotavapor a 50°C por 20 rpm. El extracto clorofórmico se colocó en el rotavapor a 60°C por 35 rpm y el extracto metanólico se colocó en el rotavapor a 70°C por 30 rpm.



FIGURA 1: Obtención de los extractos de diferente polaridad.



FIGURA 2: Destilación del extracto clorofórmico, en el rotavapor

Cepas fúngicas

Se emplearon 16 cepas de Levaduras:

Levaduras

- *Candida albicans* (caso clínico)
- *Candida albicans* ATCC 14065
- *Candida albicans* ATCC 32354
- *Candida albicans* CDBB-L- 1003
- *Candida glabrata* CDBB-L-1536
- *Candida tropicalis* (caso clínico) Hospital Los Ángeles
- *Candida tropicalis* CDBB -L- 1098
- *Candida tropicalis* (caso clínico)
- *Candida tropicalis* (caso clínico) Hospital los Ángeles
- *Candida albicans* ATCC-10231 Sensible
- *Cándida albicans* Resistente
- *Candida glabrata* CBS 138
- *Candida glabrata* (caso clínico) Resistente
- *Cándida albicans* (caso clínico)
- *Cándida glabrata* (caso clínico)
- *Cándida tropicalis* (caso clínico)

3. Evaluación cualitativa

El análisis cualitativo de la actividad antifúngica sobre levaduras se realizó por el método de difusión en agar, utilizando como medios de cultivo Agar Papa Dextrosa (PDA) y caldo Sabouraud. Se impregnaron sensidiscos con 4 mg/10 μ L de cada extracto, adicionando como control positivo sensidiscos con 25 μ g de Nistatina. Las cajas fueron incubadas a 36°C de 16-24 horas y se midió el diámetro del área de inhibición (CLSI, 2012).

4. Evaluación cuantitativa

Se determinó la Concentración Fungicida Media (CF₅₀) y la Concentración Fungicida Mínima (CFM), en las levaduras utilizando el método de micro dilución, para lo cual fueron empleadas placas de ELISA en donde se colocaron las siguientes concentraciones del extracto: 40.0, 20.0, 10.0, 5.0, 2.5, 1.25 y 0.65 mg/mL disueltos en 50 μ L caldo Sabouraud. Posteriormente se colocaron, 50 μ L de levaduras a una concentración de 1x10⁵ UFC/mL. Se contó con un grupo testigo sin el extracto. Cada ensayo se realizó por triplicado (CLSI, 2012).

5. Evaluación de la actividad fungistática o fungicida

Para determinar si los extractos presentan actividad fungistática o fungicida se llevó un control de la cinética del crecimiento de levaduras, las cuales fueron sometidas a distintas concentraciones del extracto ($1/2$ CF_{50} , CF_{50} y CFM)

6. 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 placa de ELISA por triplicado. La absorbancia se midió a 517 nm en un lector de ELISA.

7. Composición química

Se realizó su caracterización química mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución con 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 μ m.
- El extracto metanólico se corrió con una mezcla de metanol-acetonitrilo-ácido fosfórico 1% (25:25:50)
- Flujo: 1 mL/min
- Detector de arreglo de diodos (DAD)
- Longitud de onda de 245nm, 280nm 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 espectrofotómetro de masas de 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 de gas seco fue 250°, 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 de 50-1300m/z, la tasa de adquisición de MS fue de 1 espectro/s.

Se utilizó una columna Kinetex 2.6 μ , C1800A (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 0.2ml/min y el volumen de inyección fue de 20 μ L (3 mg/ml). Finalmente, el cromatograma fue comparado con los estándares (Rivera- Yáñez, 2017).

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: 29.9ml/mn
- Flujo de corrida: 35 cm/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: 35-600m/z

8. Cuantificación de fenoles totales

Los fenoles fueron cuantificados mediante el método modificado de Singleton 1999, 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. El estándar de referencia fue el ácido gálico a una concentración de 0.2mg/mL, los resultados se expresaron como equivalentes de ácido gálico.

9. 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 ($AlCl_3$) al 2% en metanol (Amaya y Portillo, 2013). Las absorbancias se leen a 415 nm y el contenido de flavonoides totales se determinó usando una curva patrón de quercetina.

VI. RESULTADOS

11.1 Características organolépticas

De forma cualitativa se observó que el propóleo de Chihuahua presentó las siguientes características

Cuadro 3: Características organolépticas para el propóleo de Chihuahua

COLOR	Pardo
AROMA	Resinoso
SABOR	Balsámico
CONSISTENCIA	Rígido

11.2 Rendimiento del propóleo

En el cuadro 4 se puede observar los rendimientos en gramos y porcentaje para cada extracto, siendo el extracto clorofórmico el que obtuvo mayor rendimiento.

CUADRO 4: Rendimientos de los extractos obtenidos del propóleo de CHIHUAHUA

EXTRACTOS	RENDIMIENTOS (g)	RENDIMIENTO (%)
HEXÁNICO	13.1	6.88
CLOROFÓRMICO	105.60	55.49
METANÓLICO	71.59	37.62

11. 3 Pruebas cualitativas de la actividad antifúngica

En el cuadro 5 se muestran los halos de inhibición de cada extracto frente a diferentes cepas de *Candida*.

CUADRO 5: Actividad antifúngica del propóleo, sobre 17 cepas de levadura. Longitud promedio expresada en mm, de los halos de inhibición y con su desviación estándar.

	CEPA	NISTATIN A	HEXÁNIC O	CLOROFÓRMIC O	METANOLIC O
1	<i>C. albicans</i>, caso clínico	16.5 ± 4.00	0.00	6.00 ± 0	6.00 ± 0.00
2	<i>C. albicans</i> ATCC 14065	22.00 ± 1.00	0.00	6.66 ± 0.57	6.66 ± 0.57
3	<i>C. albicans</i> ATCC 32354	20.33 ± 0.57	0.00	4.33 ± 3.78	6.00 ± 0.00
4	<i>C. albicans</i> CDBB-L- 1003	20 ± 0.00	0.00	7.33 ± 0.57	7.33 ± 0.57
5	<i>C. glabrata</i> CDBB-L- L1536	23.33 ± 0.57	0.00	6.00 ± 0	6.00 ± 0.00
6	<i>C. tropicalis</i>, donada por el hospital los Ángeles	9.33 ± 0.57	0.00	6.66 ± 0.57	6.66 ± 0.57
7	<i>C. tropicalis</i> CDBB-L- 1098	15.66 ± 0.57	0.00	6.66 ± 0.57	6.33 ± 0.57
8	<i>C. tropicalis</i>, caso clínico	20.00 ± 0.00	0.00	6.66 ± 0.57	6.66 ± 0.57
9	<i>C. tropicalis</i>, donada por	20.33 ± 0.57	0.00	6.00 ± 0	7.00 ± 0.00

	el hospital los Ángeles				
10	<i>C. albicans</i> ATCC-10231	20.00 ± 0.00	0.00	6.00 ± 0	6.00 ± 0.00
11	<i>C. albicans</i> , resistente	11.00 ± 1.73	0.00	6.00 ± 0	6.66 ± 1.15
12	<i>C. glabrata</i> CBS 138	13.33 ± 5.77	0.00	6.33 ± 0.57	6.00 ± 0.00
13	<i>C. glabrata</i> , caso clínico	21.33 ± 1.25	0.00	6.66 ± 0.57	6.00 ± 0.00
14	<i>C. albicans</i> , caso clínico	18.66 ± 1.15	0.00	6.00 ± 0	6.66 ± 0.57
15	<i>C. glabrata</i> , caso clínico	14.00 ± 3.46	0.00	6.00 ± 0	5.22 ± 0.57
16	<i>C. tropicalis</i> , caso clínico	18.66 ± 2.30	0.00	7.33 ± 0.57	7.33 ± 0.57

En el cuadro 5 se muestra el diámetro de los halos de inhibición de las 16 cepas de levaduras, frente a los diferentes extractos. Los sensibilizadores tenían una concentración de 4mg. Los halos de inhibición fueron reportados en mm y su desviación estándar.

Se puede observar en la figura 3 que los halos con mayor diámetro fueron los de la Nistatina en todas las especies de *Candida*; sin embargo, las cepas también muestran halos de inhibición a los extractos clorofórmico y metanólico, como las cepas de *C. albicans* y *C. tropicalis* que muestran la mayor sensibilidad (Figura 3). Por otro lado, el extracto hexánico no tuvo actividad.

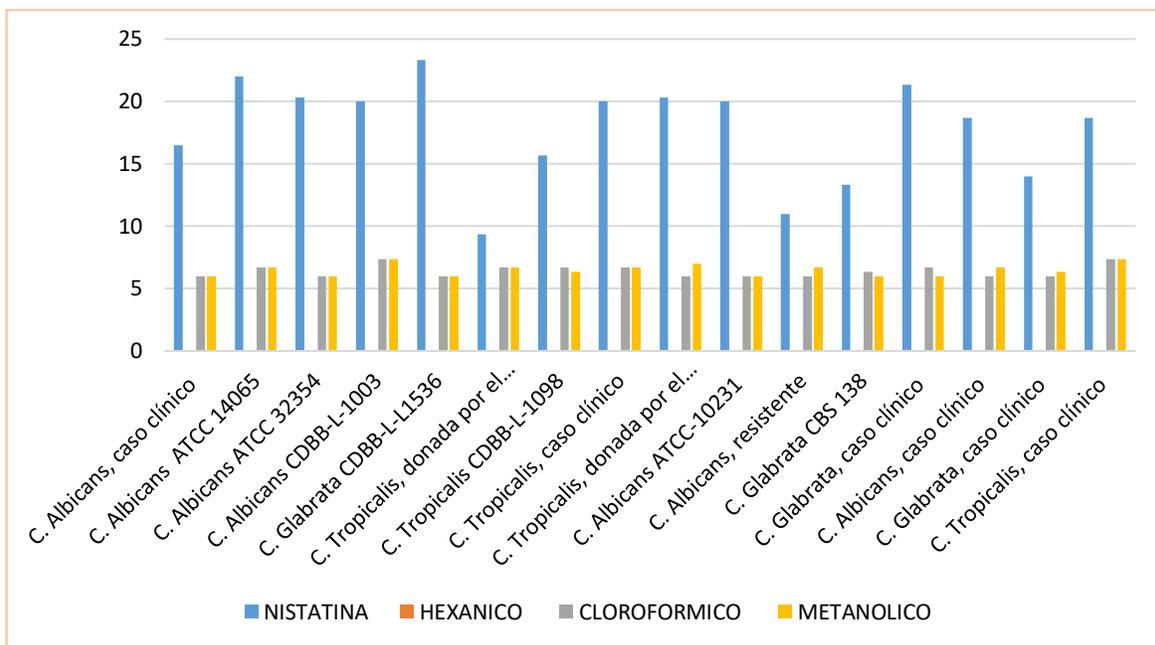


FIGURA 3: Halos de inhibición de cada cepa de *Candida* frente a los diferentes extractos de un propóleo de Chihuahua.

VII. PRUEBAS CUANTITATIVAS

Los resultados de CFM y CF₅₀ en hongos levaduriformes se muestran en el cuadro 6 y se obtuvieron, únicamente para el extracto metanólico.

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

CEPAS	TESTIGO	CF ₅₀ (mg/mL)	CFM (mg/mL)
<i>C. albicans</i>, caso clínico	8.00E+03	0.625	1.25
<i>C. albicans</i> ATCC 14065	1.00E+12	0.625	1.25
<i>C. albicans</i> ATCC 32354	1.00E+11	0.625	1.25
<i>C. albicans</i> CDBB-L-1003	1.00E+12	0.625	1.25
<i>C. glabrata</i> CDBB-L-L1536	1.00E+12	0.625	1.25
<i>C. tropicalis</i>, donada por el hospital los Ángeles	1.00E+12	0.625	1.25
<i>C. tropicalis</i> CDBB-L-1098	1.00E+12	0.625	1.25

<i>C. tropicalis</i>, caso clínico	1.24E+10	0.625	1.25
<i>C. tropicalis</i>, donada por el hospital los Ángeles	1.00E+12	0.625	1.25
<i>C. albicans</i> ATCC-10231		0.625	1.25
<i>C. albicans</i>, resistente	1.00E+12	0.625	1.25
<i>C. glabrata</i> CBS 138	1.00E+12	0.625	1.25
<i>C. glabrata</i>, caso clínico	1.00E+12	0.625	1.25
<i>C. albicans</i>, caso clínico	1.00E+12	0.625	1.25
<i>C. glabrata</i>, caso clínico	1.00E+12	0.625	1.25
<i>C. tropicalis</i>, caso clínico	3.20E+04	0.625	1.25

En el cuadro 6 se observa que se obtuvo una CFM de 1.25 mg/mL y una CF₅₀ de 0.625 mg/mL, para todas las especies de *Candida*.

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

Los resultados de la actividad del extracto metanólico en 3 concentraciones diferentes (CF₅₀, CF₂₅ y CFM), además de un grupo testigo (sin tratamiento), sobre 4 cepas de *Candida*.

La figura 4 muestra el crecimiento por 48 horas de *Candida albicans*¹ (caso clínico) Laboratorio de Análisis clínicos de FES-I, al ser expuesta a las tres concentraciones. Se puede observar que el grupo testigo siguió proliferando como era esperado en todo el experimento, al comparar las diferentes concentraciones, se observa que la concentración de 1.25 mg/mL (CFM) alcanzó las cero UFC a partir de las 8 horas y a las 20 horas regreso a cero y se mantuvo así hasta finalizar el experimento. Para la concentración de 0.625 mg/mL (CF₅₀), presentó crecimiento en las primeras dos horas, pero después regresó a cero y así se mantuvo hasta finalizar el experimento. Por otro lado, para la concentración de 0.312 mg/mL (CF₂₅), no alcanzó las cero UFC, aunque, sus valores se mantuvieron por debajo del grupo testigo y disminuyeron a lo largo del experimento.

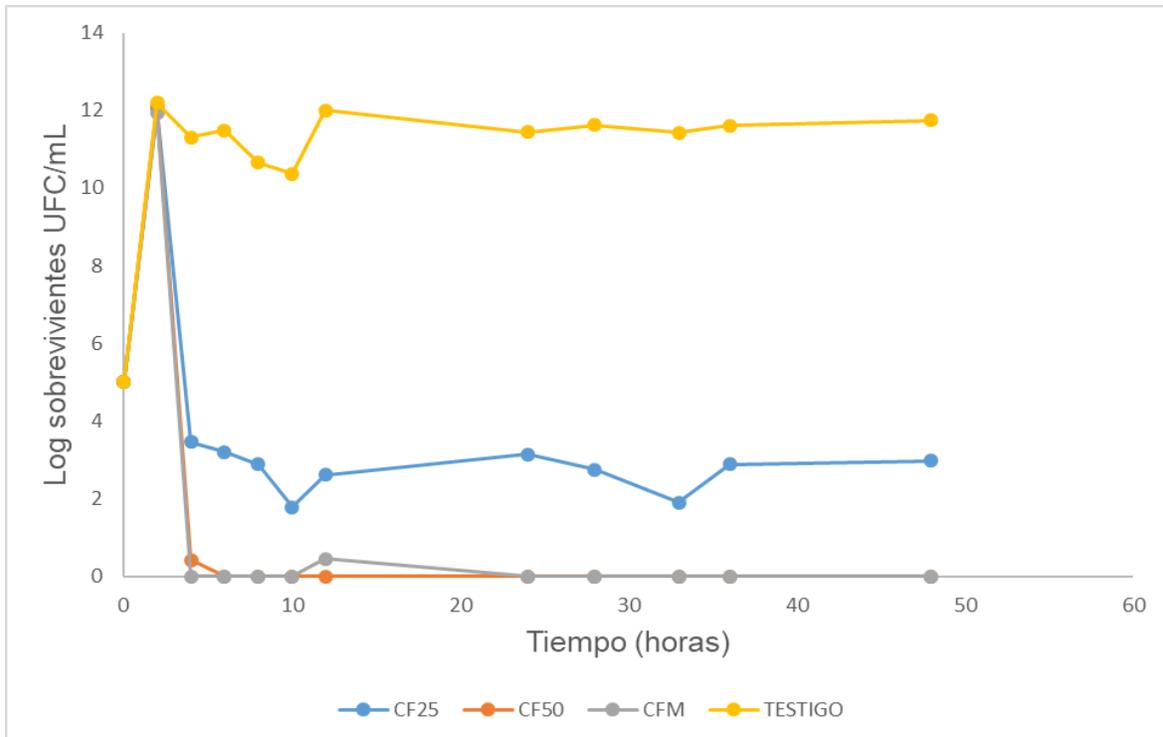


FIGURA 4: Actividad del extracto metanólico del propóleo sobre curva de crecimiento de *Candida albicans*¹ (caso clínico) Laboratorio de Análisis clínicos de FES-I CFM=1.25 mg/mL, CF₅₀=0.625 mg/mL, CF₂₅=0.312 mg/mL

La figura 5 muestra el crecimiento por 48 horas de *Candida albicans*¹¹ caso clínico al ser expuesta a las tres concentraciones. Se puede observar que el grupo testigo siguió proliferando como era esperado en todo el experimento, al comparar las diferentes concentraciones, se observa que la concentración de 1.25 mg/mL (CFM) tuvo crecimiento a las 2 horas y alcanzó las cero UFC a partir de las 4 horas. Se mantuvo así hasta finalizar el experimento. Para la concentración de 0.625 mg/mL (CF₅₀), presentó crecimiento a las dos y cuatro horas, pero después alcanzó las cero UFC y presentó crecimiento a las 28 horas, después regresó a cero y así se mantuvo hasta finalizar el experimento. Por otro lado, para la concentración de 0.312 mg/mL (CF₂₅), no alcanzó las cero UFC, aunque, sus valores se mantuvieron por debajo del grupo testigo y disminuyeron a lo largo del experimento.

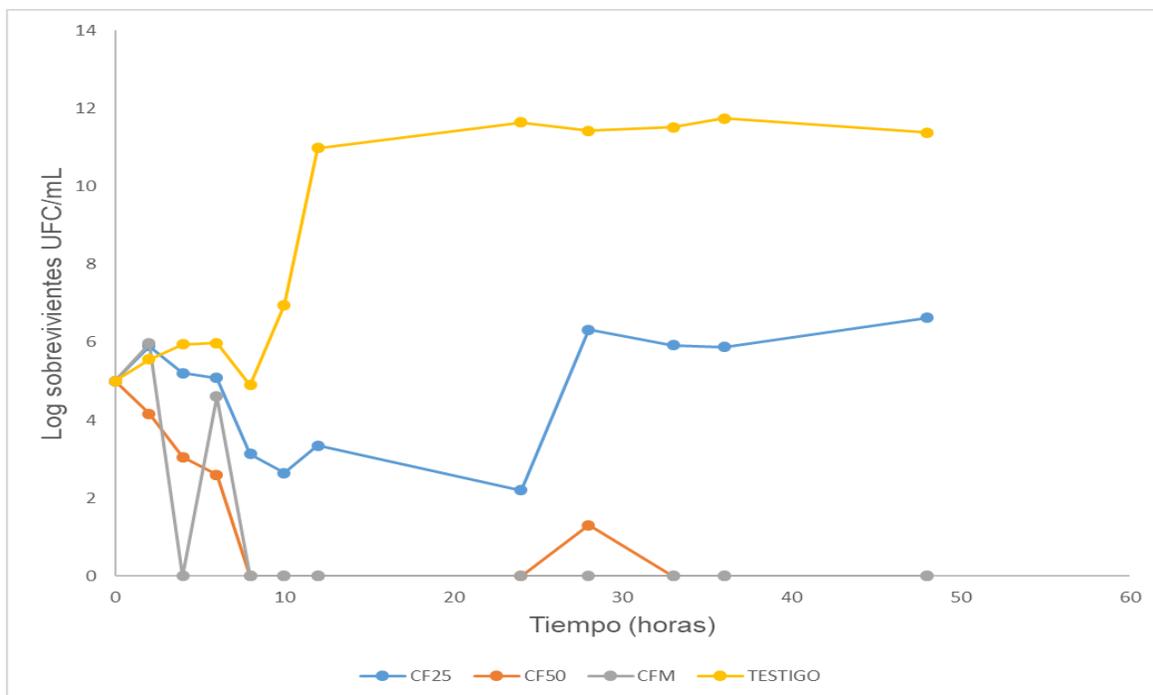


FIGURA 5: Actividad del extracto metanólico del propóleo sobre curva de crecimiento de *Candida albicans*¹¹ caso clínico CFM=1.25 mg/mL, CF₅₀=0.625 mg/mL, CF₂₅=0.312 mg/mL

La figura 6 muestra el crecimiento por 48 horas de *Candida tropicalis*¹¹ caso clínico al ser expuesta a las tres concentraciones. Se puede observar que el grupo testigo siguió proliferando como era esperado en todo el experimento, al comparar las diferentes concentraciones, se observa que la concentración de 1.25 mg/mL (CFM) nunca pudo alcanzar las cero UFC, pero siempre se mantuvo abajo del grupo testigo, así como la concentración de 0.625 mg/mL (CF₅₀), ambas disminuyeron su crecimiento a partir de las cuatro horas y así se mantuvieron hasta finalizar el experimento. Por otro lado, la concentración de 0.312 mg/mL (CF₂₅) disminuyó su crecimiento a las cuatro horas, y después aumentó su crecimiento a las seis horas y siguió aumentando, aunque siempre se mantuvo por debajo del grupo testigo.

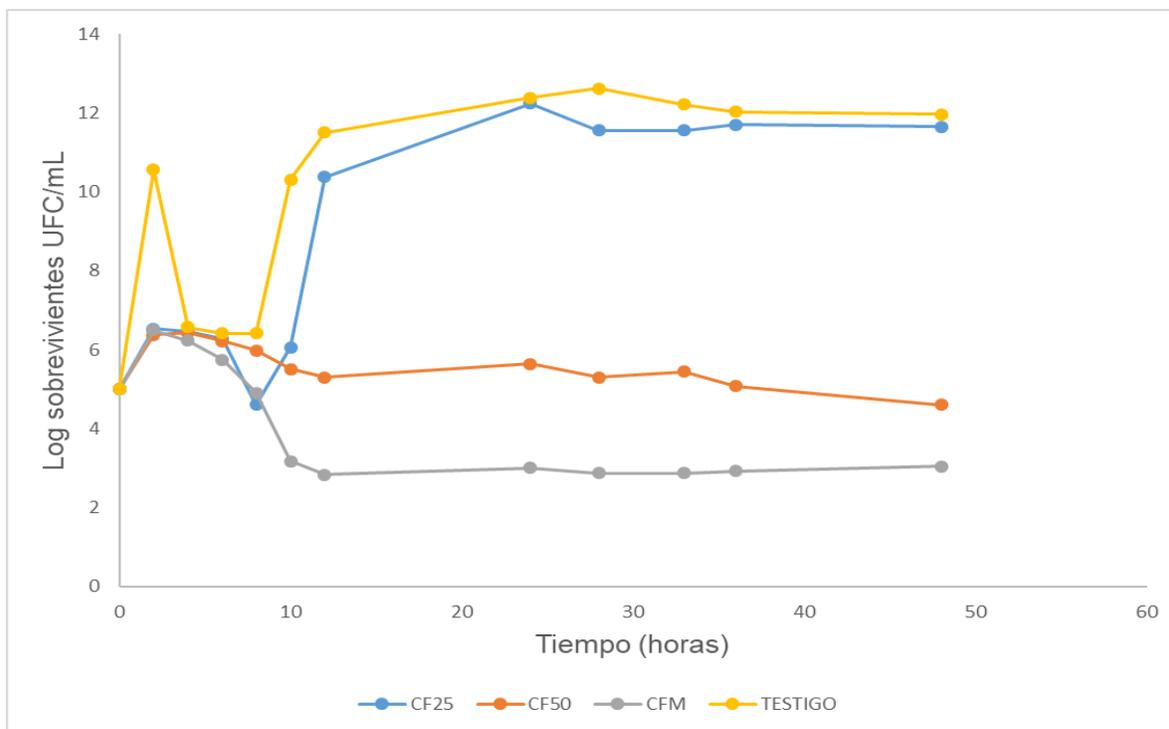


FIGURA 6: Actividad del extracto metanólico del propóleo sobre curva de crecimiento de *Candida glabrata*¹⁷ caso clínico CFM=1.25 mg/mL, CF₅₀=0.625 mg/mL, CF₂₅=0.312 mg/mL

La figura 7 muestra el crecimiento por 48 horas de *Candida tropicalis*¹⁷ caso clínico al ser expuesta a las tres concentraciones. Se puede observar que el grupo testigo siguió proliferando como era lo esperado en todo el experimento, al comparar las diferentes concentraciones, se observa que la concentración de 1.25 mg/mL (CFM) alcanzó las cero UFC a las seis horas, y así se mantuvo hasta finalizar el experimento. La concentración de 0.625 mg/mL (CF₅₀) tuvo un crecimiento a las 24 horas, regresó a cero a las 28 horas y a las 48 horas presentó crecimiento, siempre debajo del grupo control. Por último, la concentración de 0.312 mg/mL (CF₂₅) nunca alcanzó las cero UFC, aunque sus valores se mantuvieron por debajo del grupo testigo y el disminuyeron en las primeras horas y en el último tiempo.

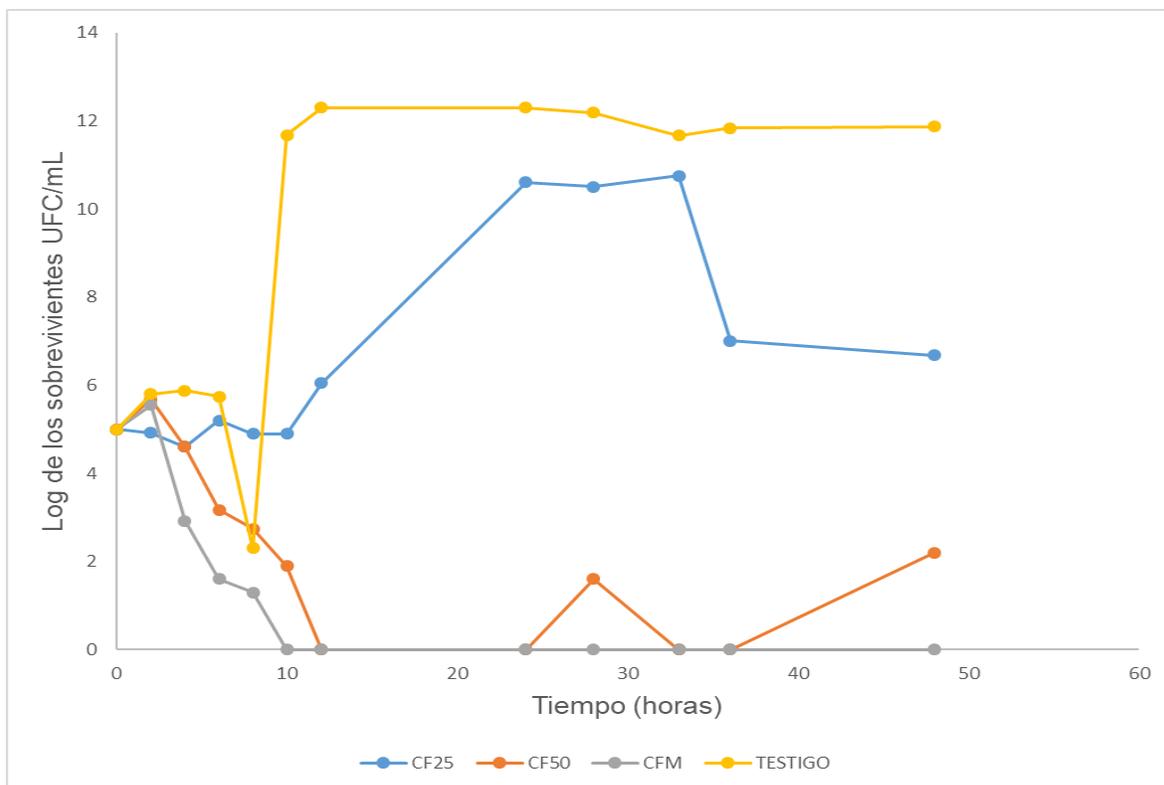


FIGURA 7: Actividad del extracto metanólico del propóleo sobre curva de crecimiento de *Candida tropicalis*¹⁸ caso clínico CFM=1.25 mg/mL, CF₅₀=0.625 mg/mL, CF₂₅=0.312 mg/mL

13. Capacidad antioxidante, fenoles y flavonoides

La capacidad antioxidante media se muestra en el cuadro 7, además del índice de actividad antioxidante (AAI) (Scherer y Teixeira, 2009), con el cual se determinó que la capacidad antioxidante del extracto metanólico es pobre y en el caso del extracto clorofórmico es muy fuerte.

CUADRO 7: Concentración de fenoles, flavonoides y capacidad antioxidante de los extractos del propóleo de Chihuahua.

EXTRACTO	FENOLES TOTALES (mg eAG/g)	FLAVONOIDES (mg eQ/g)	CA₅₀ (μL/mL)	AAI
HEXÁNICO			403.14	0.1 Pobre
CLORÓFORMICO	21.94	18.06	6.17	4.9 Muy fuerte
METANÓLICO	430	15.51	93.47	0.3 Pobre

e AG/g= Equivalentes de ácido gálico por gramos de extracto.

e Q= Equivalentes de Quercetina por gramo de extracto.

AAI: Índice de Actividad Antioxidante

Criterio: Pobre actividad (< 0.5), Moderada (0.5-1.0), Fuerte (1.0-2.0), Muy fuerte (>2.0).

14. Composición química

14.1 Cromatografía Líquida De Alta Resolución (HPLC)

El extracto metanólico fue sometido a una cromatografía líquida de alta resolución, a continuación, se presentan los cromatogramas correspondientes y los grupos identificados (Figura 8).

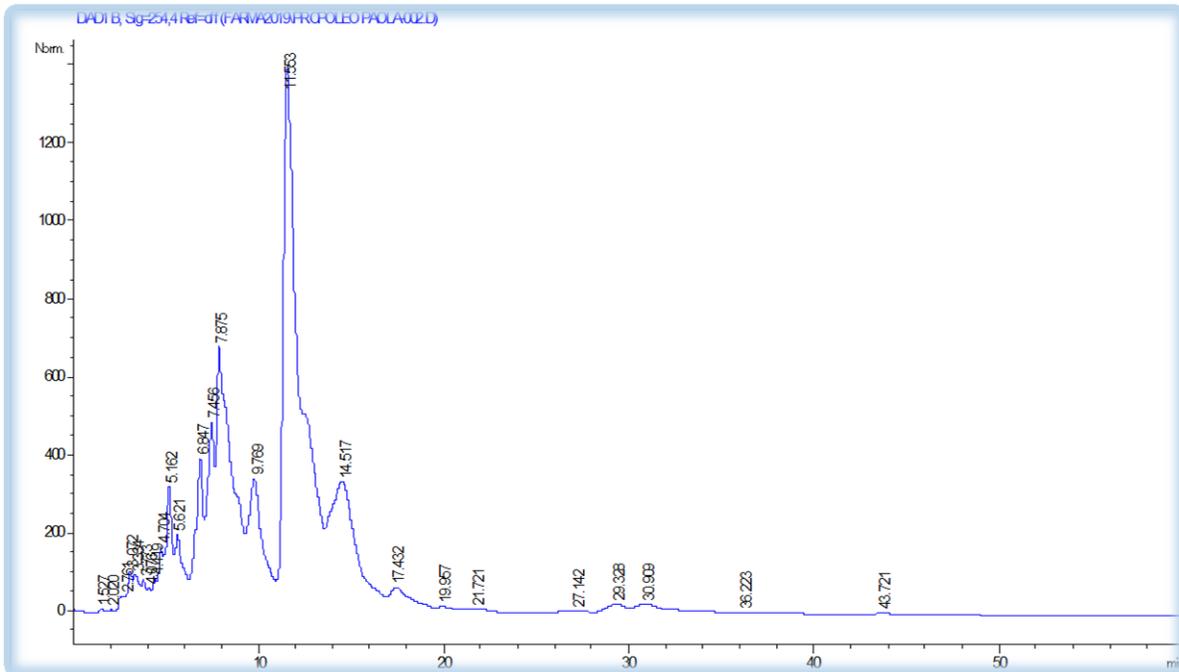
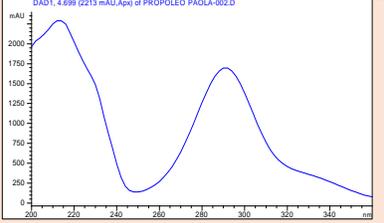
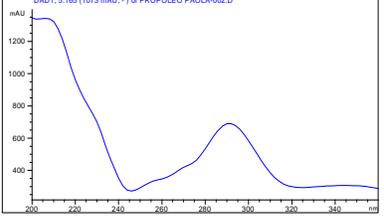
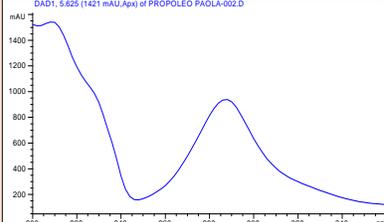
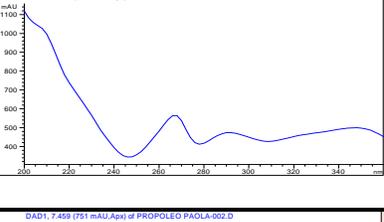
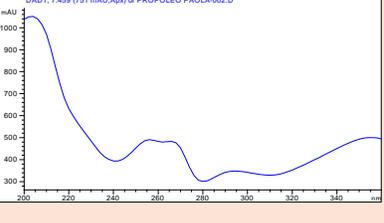
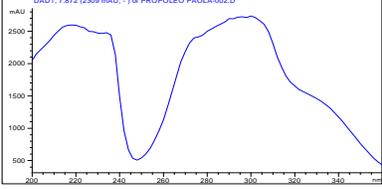
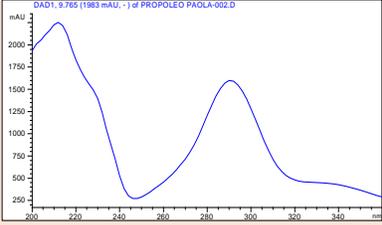
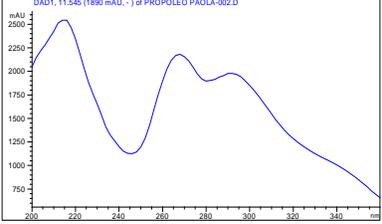
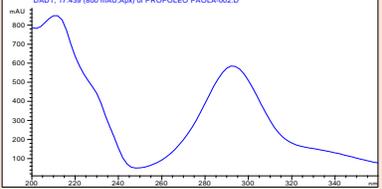
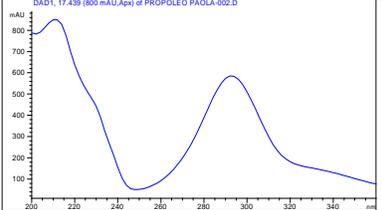


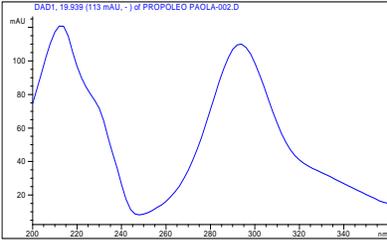
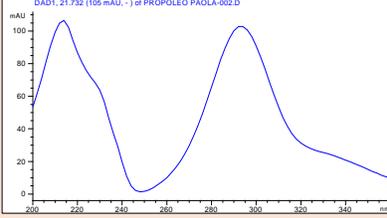
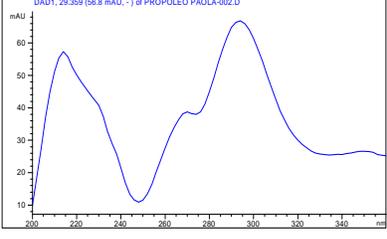
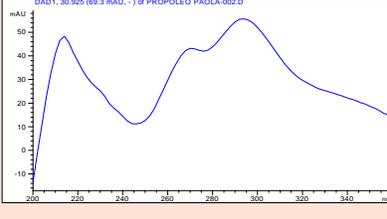
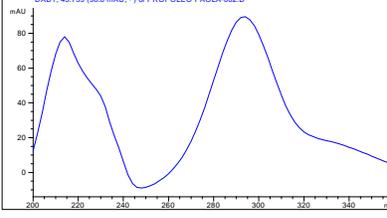
FIGURA 8: Cromatograma de la cromatografía líquida de alta resolución del extracto metanólico de propóleo a 254 nm.

En el cuadro 10 se presentan los compuestos identificados mediante HPLC-DAD, aquellos que no coincidieron con la base de datos se determinaron a un nivel de grupo, de acuerdo con los espectros UV Harborne, 1998.

CUADRO 8: Compuestos detectados en la cromatografía líquida de alta resolución del extracto metanólico a 254 nm.

No. DE PICO	TIEMPO DE RETENCIÓN	λ MAX	ESPECTRO V	NOMBRE
1	4.699	290	 <p>DAD1, 4.699 (2213 mAU.Aps) of PROPOLEO PAOLA-002.D</p>	Fenol
2	5.165	290	 <p>DAD1, 5.165 (1073 mAU, -) of PROPOLEO PAOLA-002.D</p>	Fenol
3	5.625	288	 <p>DAD1, 5.625 (1421 mAU.Aps) of PROPOLEO PAOLA-002.D</p>	Fenol
4	6.852	292,348	 <p>DAD1, 6.852 (775 mAU.Aps) of PROPOLEO PAOLA-002.D</p>	Flavona
5	7.459	258,264,294,354	 <p>DAD1, 7.459 (751 mAU.Aps) of PROPOLEO PAOLA-002.D</p>	Flavonol

6	7.872	234,300		Fenol
7	9.765	290		Flavonoide
8	11.545	266,292		Flavonoide
9	17.493	268,292		Fenol
10	17.439	294		Fenol

11	19.939	292		Fenol
12	21.732	292		Fenol
13	29.359	270,294		Flavonoide
14	30.925	290,294		Fenol
15	43.759	294		Fenol

14.2 Cromatografía Líquida De Alta Resolución Acoplada A Espectrometría De Masas (HPLC-Ms).

Los resultados del extracto metanólico se muestran en el cuadro 11:

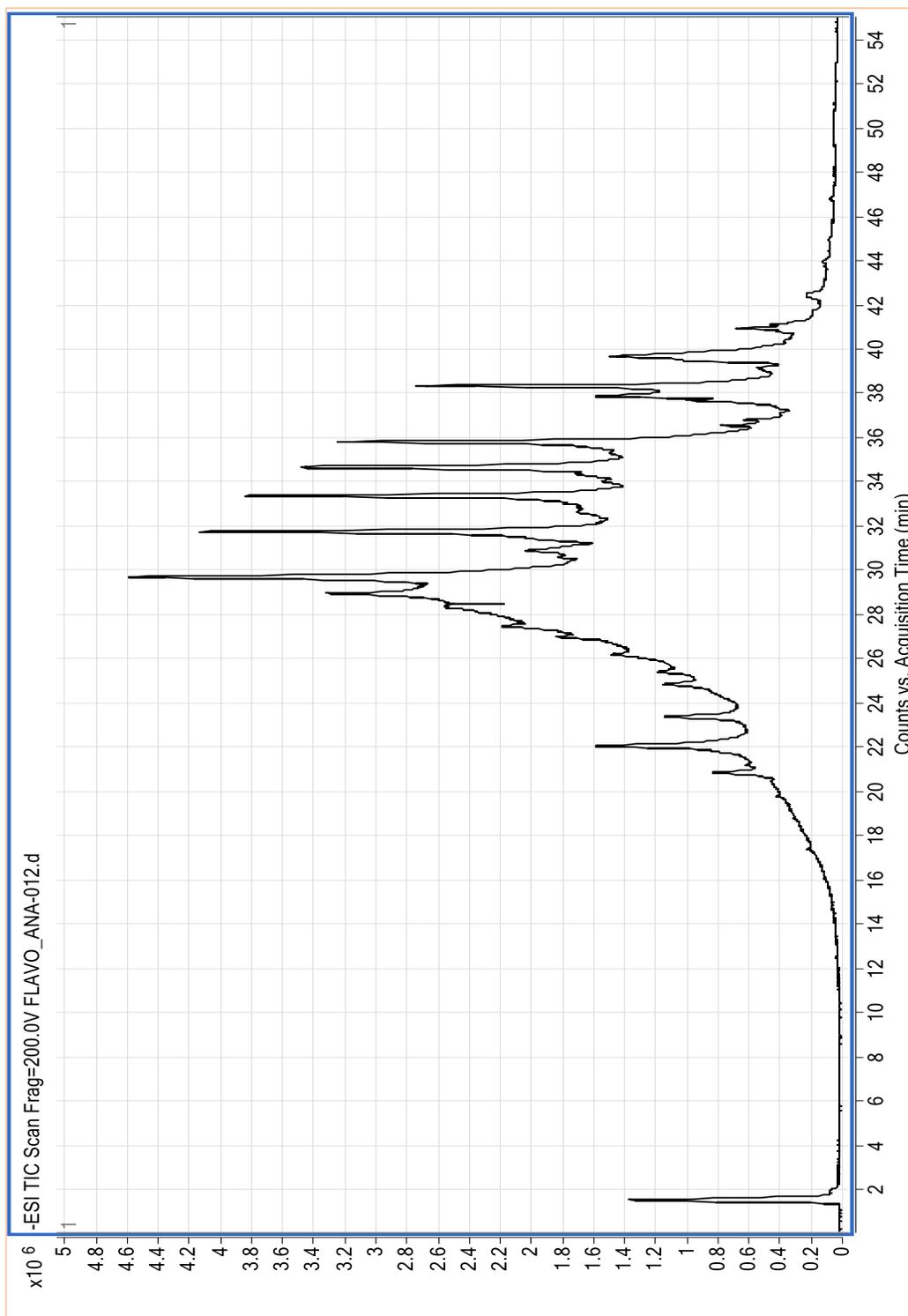


FIGURA 9: Cromatograma de la Cromatografía Líquida de Alta Resolución acoplada a Espectrofotometría de Masas del extracto metanólico del propóleo

En el cuadro 11 se pueden observar los compuestos identificados por el HPLC-MS a partir de su base de datos del extracto metanólico del propóleo.

CUADRO 9: Compuestos presentes en el extracto metanólico de propóleo, detectados en el HPLC-MS

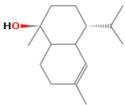
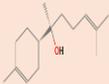
IÓN (m/z)	TIEMPO DE RETENCIÓN (min)	ABUNDANCIA	COMPUESTO	ACTIVIDAD
285.0626	20.78	333490	LUTEOLINA	Acción antioxidante, antiinflamatoria y antimutagénico (Lima, et al., 2009)
271.0467	21.99	1051673	NARINGENINA	Acción antioxidante, antitrombóticas y antiinflamatoria (Cuesta et al., 1997).
285.0268	25.33	361955.6	KAEMFEROL	Inhibe el crecimiento de células cancerosas y tiene acción antioxidante (Chen et al., 2013)
255.035	28.87	1266438	PINOCEMBRINA	Acción antimicrobiana, antimicótica, antifúngica (Bankova et al., 2000)

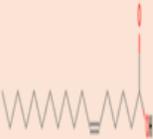
253.02	29.63	2271892	CRISINA	Efecto citotóxico sobre células cancerosas (da Silva Frozza et al., 2013), antiproliferación (Paula, 2012), anti UV (Boutabet, et al., 2011).
269.0128	30.81	1184449	APIGENINA	Supresor de tumores (Muñoz et al, 2001; McVean et al, 2000).

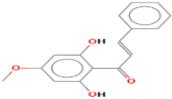
14.3 Cromatografía De Gases Acoplada A Espectrometría De Masas (Gc-Ms).

Los extractos hexánico y clorofórmico fueron analizados por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas, los cromatogramas se muestran en la figura 10.

CUADRO 10: Compuestos identificados de la Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas del extracto hexánico del propóleo.

COMPUESTO	ESTRUCTURA	TR	(%) TOTAL	ACTIVIDAD
δ-Cadinene		11.489	93	Este compuesto se obtiene en aceites esenciales de plantas y tiene propiedades antimicrobianas y anti moduladoras (Chaverri, et al., 2017)
α- Cadinol		12.707	94	Tiene una acción antifúngica (Romeu, et al., 2004).
BISABOLOL		12.874	93	Propiedades calmantes y antiinflamatorias (Gómez, et al., 2015)
2-HEPTADECANO NA		14.324	93	Actividad antiparasitaria (Silva. Et al., 2014)
ÁCIDO PALMITICO		14.44	98	Tiene propiedades anticancerígenas

				(Herrera, et al 2006)
HEXADECYLOX IRANO		15.126	94	Acción antioxidante (Raton et al., 2014)
ALCOHOL ESTEÁRILICO		15.126	91	Usos cosméticos y farmacéuticos
ÉSTERES METÁLICOS DE ÁCIDOS GRASOS		15.633	99	Actividad antimicrobiana (Aluyor et al., 2008)
ÁCIDO ESTEÁRICO		15.787	99	Actividad antioxidante (Fernández et al., 1995)
EICOSANO		16.3	98	Actividad antibacteriana en plantas (Bakker et al., 2006)
ÁCIDO OLÉICO		15.947	97	Previene problemas cardiovasculares, es hipotensor y reduce el riesgo de padecer artritis reumatoide (González et al., 1999)
8-HEPTILPENTADECANO		16.3	91	Actividad antibacteriana en plantas (Bakker et al., 2006)

1,19-EICOSADIENO		16.582	96	Protege a las plantas contra infecciones de hongos (Ozyurt et al., 2006)
ACIDO NONADECANOICO		17.416	99	Ayudan en la absorción de nutrientes en las plantas (López et al., 2012)
ÁCIDO DOCOHEXAENOICO		18.571	96	Ayuda a combatir el Alzheimer (Gil et al., 2003)
PINOSTRIBIN CHALCONE		18.956	95	Actividad antimicrobiana

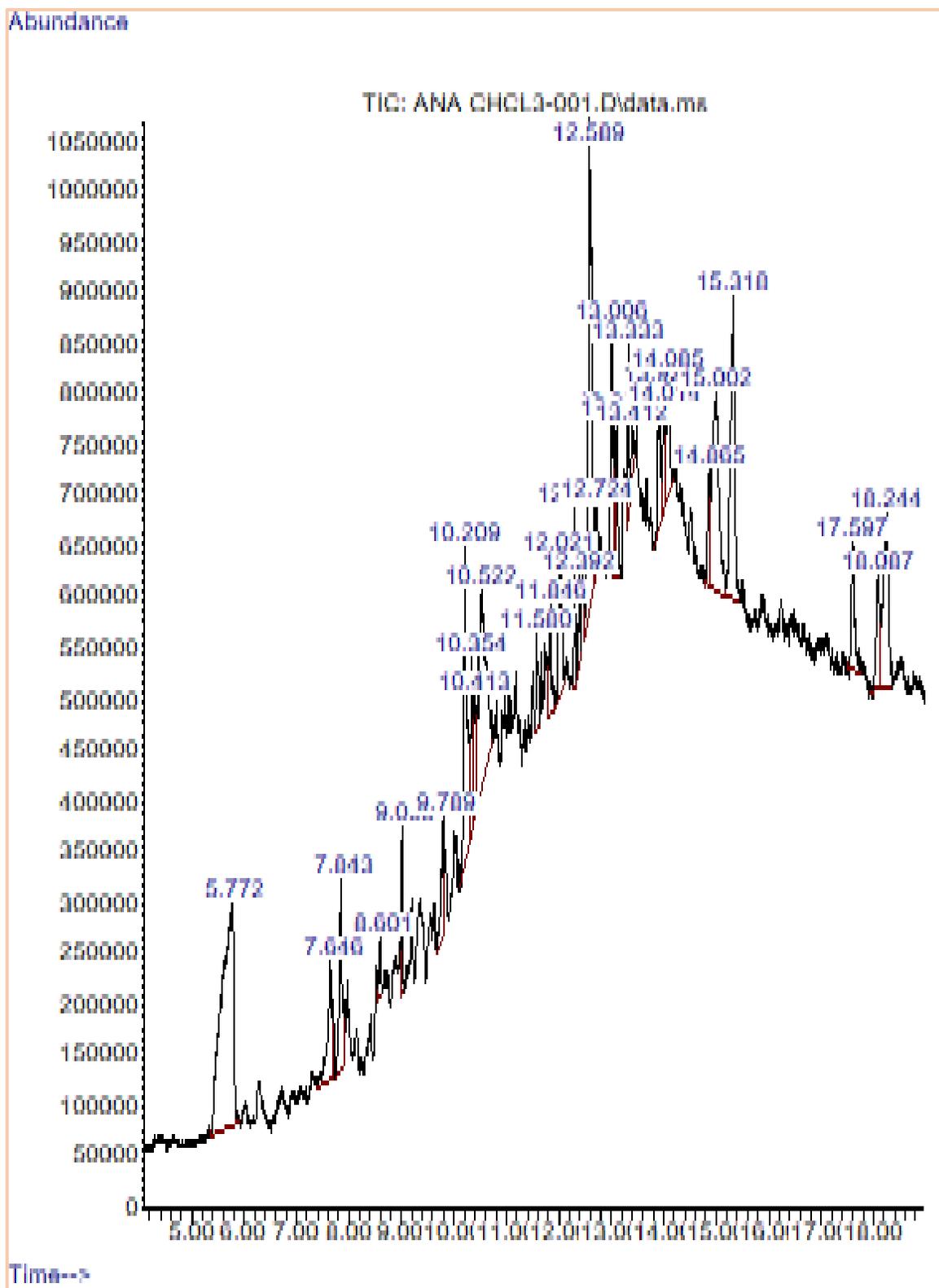
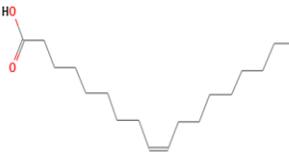


FIGURA 10: Cromatograma de la Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas del extracto clorofórmico del propóleo.

Después del análisis del extracto clorofórmico en GC-MS se identificaron los compuestos principales, expresados en el cuadro 13:

CUADRO 11: Compuestos identificados de la Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas del extracto clorofórmico del propóleo.

COMPUESTO	ESTRUCTURA	TIEMPO DE RETENCIÓN	% DE TOTAL	ACTIVIDAD
ÁCIDO PALMÍTICO		1.09	92	Tiene propiedades anticancerígenas (Herrera et al., 2006)
Ácido oleico		5.97	95	Previene problemas cardiovasculares, es hipotensor y reduce el riesgo de padecer artritis reumatoide (González, et al., 1999)
EICOSANO		1.81	89	Actividad antibacteriana en plantas (Ozyurt et al., 2006)

HEPTADECANO		10.17	95	Es un hidrocarburo que se encuentra en las ceras de muchas plantas, se sabe que sirve para atraer polinizadores (Grajales, <i>et al.</i> , 2011)
1,54-dibromotetrapentacotane		7.54	93	Acción antioxidante (Zubair, <i>et al.</i> , 2013).

VIII. DISCUSIÓN

El aumento en la prevalencia de la micosis, la aparición de cepas fúngicas resistentes a los agentes antimicóticos empleados en la actualidad y los efectos secundarios que estos provocan en los pacientes, son indicadores de encontrar nuevos compuestos que cumplan con los requerimientos antifúngicos ideales (Quintero et al., 2008). Recientemente el propóleo ha atraído la atención de muchos investigadores debido a sus actividades biológicas y terapéuticas, también ha demostrado su actividad antifúngica, la cual se ha evaluado en los últimos años. Las propiedades biológicas y farmacológicas más estudiadas son aquellas que lo describen como agente antiinflamatorio, antioxidante, antiséptico entre otras (Peña, 2008). Además, se sabe que estas propiedades dependen de la composición química las cuales se asocian con la región geográfica, temporada, vegetación y el solvente de extracción (Quintero et al., 2008). A pesar que las investigaciones se han centrado en las diferentes actividades del propóleo, aún faltan antecedentes donde comparen diferentes extractos de un solo propóleo.

Tras la experimentación con los extractos hexánico, clorofórmico y metanólico, las pruebas cualitativas sobre las especies de *Candida* demostraron ser sensibles al extracto metanólico (Cuadro 5 y Figura 3), donde los mayores halos se presentaron en *C. albicans*, *C. tropicalis* en 4 casos clínicos y *C. glabrata* caso clínico. Esto concuerda con Tobaldini et al. en 2016, quienes evaluaron un extracto etanólico de un propóleo verde de Brasil y encontraron una fuerte actividad inhibitoria en diferentes cepas de *Candida*. La actividad del propóleo es compleja a esta se le atribuye la sinergia que hay entre sus diferentes compuestos biológicos, principalmente fenoles y flavonoides (Tobaldini et al. 2016). Los flavonoides constituyen una clase muy importante de polifenoles, ampliamente presentes en los propóleos, y a estos se les atribuye su actividad biológica (Bedascarrasbure, et al., 2004). Por otra parte, el extracto hexánico no tuvo ninguna actividad antifúngica, esto se debe a que las propiedades químicas moleculares del solvente, que no inhibieron a ninguna cepa de las levaduras ya que estas determinan, la selectividad de los componentes extraídos, sino también para mejorar el rendimiento de la extracción, los solventes al ser de una polaridad más baja que el metanol, disuelven otros compuestos como ceras y lípidos (Murga et al., 2000).

Desde finales de la década de los 80 se reporta actividad fungicida del extracto etanólico de un propóleo sobre levaduras, encontrando que es fungistático a una concentración de 0.55 mg/mL (Quintero et al., 2008). Otros autores encuentran actividad fungicida en el extracto etanólico de propóleo frente a 15 cepas de levaduras, con una concentración del extracto de 3 a 7 mg/mL, siendo *C. albicans* la más sensible (Mayer et al., 2013)

En este estudio se demostró que el extracto metanólico presentó actividad inhibitoria sobre diferentes especies de *Candida*, sin embargo, su actividad fue muy diferente entre sí, presentando valores de CFM similares a los descritos para extractos obtenidos de otras partes del mundo y que van de 0.2 a 12 mg/mL (Quintero et al., 2008). En este estudio se empleó la técnica de micro dilución para la determinación de CF₂₅, CF₅₀ y CFM. La CF₂₅ fue de 0.312 mg/mL, que, aunque no logró llegar a las cero UFC, si controló el crecimiento de estas. Por otro lado, la actividad fungicida media fue de 0.625 mg/mL (CF₅₀), y una CFM de 1.25 mg/mL, lo que concuerda con los autores al estar dentro del rango de las concentraciones fungicidas, donde también *C. albicans* resultó ser más sensible, seguida de *C. tropicalis* y *C. glabrata*.

Independientemente de las concentraciones descritas en este y otros reportes se comprueba la actividad antifúngica del propóleo que resulta de especial importancia por ser una opción terapéutica económica y poco tóxica, respecto a los antimicóticos tradicionales, interés que se ve favorecido por la inclinación del ser humano hacia el aprovechamiento de productos naturales para afrontar sus problemas de salud,

particularmente porque los extractos metanólicos de los propóleos han resultado ser tan efectivos como la nistatina e incluso superan a otros antifúngicos.

Se realizaron curvas de crecimiento del extracto metanólico en 2 cepas de *C. albicans* caso clínico, una cepa de *C. glabrata* caso clínico y una cepa de *C. tropicalis* caso clínico, para evaluar la actividad del propóleo. Para cada cepa se emplearon 3 concentraciones del extracto (CFM:1.25 mg/mL, CF₅₀:0.625 mg/mL, CF₂₅:0.312 mg/mL), además de un grupo testigo. En los 2 casos de *C. albicans* casos clínicos, se obtuvo un efecto fungicida a partir de las primeras 2 horas, esto para las concentraciones de CFM:1.25 mg/mL y CF₅₀:0.625 mg/mL, para CF₂₅:0.312 mg/mL, su efecto fue fungistático manteniendo el crecimiento estable y abajo del grupo testigo que continuó su crecimiento normal y esto puede deberse a que *C. albicans* tiene varios atributos de virulencia para colonizar al huésped y ocasionar daño de forma directa, al activar, resistir o desviar los mecanismos de defensa del mismo. La resistencia a los antifúngicos es un serio problema de salud, por ejemplo, los azoles generan mayor resistencia (López, et al., 2003). En un estudio realizado por Cabrera en 2017, en *C. albicans*, encontró que el propóleo inhibe parcialmente la enzima fosfolipasa, es un factor de virulencia de *Candida*, la cual ayuda a su capacidad de invasión y ayuda a su crecimiento. Además, el propóleo daña la estructura de la membrana celular, demostrando que esto es la razón principal de la muerte celular.

Para el caso de *C. glabrata* caso clínico, el propóleo mostró un efecto fungistático con las concentraciones de CFM:1.25 mg/mL, CF₅₀:0.625 mg/mL, CF₂₅:0.312 mg/mL, por lo que se mantuvo el crecimiento de las cepas por debajo del grupo testigo. Esto se explica ya que la ausencia de virulencia, como la producción de pseudo-hifas, coincide en que *C. glabrata* son menos virulentas que *C. albicans*, sin embargo, existen evidencias que demuestran una rápida diseminación de las infecciones por esta en los enfermos inmunodeprimidos. Algunas investigaciones han demostrado que *C. glabrata* produce proteinasas y que la hidrofobicidad de su superficie celular es similar a la de *C. albicans*, lo que asegura su capacidad de adherencia a las células del huésped. Otros factores relacionados con una mayor virulencia son el cambio en el fenotipo de las colonias. Algunas alteraciones del huésped que contribuyen al desarrollo de las infecciones por esta especie son la disminución en los niveles de IgA secretora vaginal, una menor respuesta inflamatoria y, sobre todo, una disminución cuantitativa o cualitativa de los linfocitos T, hecho que explica su mayor frecuencia en los pacientes con sida, trasplantados y con neoplasias (del Valle, 2015).

Para el caso de *C. tropicalis* caso clínico, para la CFM: 1.25 mg/mL obtuvo un efecto fungicida a las 8 horas, en el caso de CF₅₀:0.625 mg/mL y CF₂₅:0.312 mg/mL, mostró un efecto fungistático, por lo que se mantuvieron por debajo del grupo

testigo. Se sabe que *C. tropicalis* presenta una resistencia a la actividad biológica del propóleo. En estudios de vigilancia en Chile se ha descrito un aumento del aislamiento de especies no-*albicans* en los últimos años. Estos datos concuerdan con otros estudios de vigilancia en Norteamérica y Latinoamérica, donde se ha observado que las especies de *Candida* no-*albicans*, presentan cambios epidemiológicos continuos en su frecuencia con una tendencia al aislamiento de especies más resistentes a antifúngicos (Albuquerque *et al.*, 2009). *C. tropicalis* es una de las especies emergentes de *Candida* no-*albicans* aislada con mayor frecuencia en clínica, existen varios estudios donde comprueban la resistencia de *C. tropicalis* a los azoles. Dentro de los componentes activos, se vincula la concentración de flavonoides con la estandarización de este antifúngico (de Bedout, *et al.*, 2003).

Las propiedades observadas en el propóleo de Chihuahua, dependen básicamente de su composición química, que a su vez depende del componente químico de la resina recolectada por las abejas.

Los procesos metabólicos del cuerpo humano consisten en múltiples reacciones complejas, las cuales generan radicales libres (Zhang, *et al.*, 2014). En referencia de los radicales libres, se habla de reacciones oxido-reductoras, pues constituyen una parte esencial de metabolismos aeróbicos los organismos vivos. Los radicales libres son átomos o grupos de átomos que tienen un electrón desapareado o libre, por lo que son muy reactivos ya que tienden a captar un electrón de moléculas estables, con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica, cabe resaltar que el aumento de éstos produce el estrés oxidativo, a través del cual se induce daño a moléculas biológicas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (Verdugo *et al.*, 2017). La potente capacidad antioxidante de los propóleos ayuda en la prevención de enfermedades de gran incidencia en la sociedad moderna como es la aterosclerosis, en particular el infarto de miocardio, principal causa de mortalidad. Importantes estudios epidemiológicos realizados en Europa y Japón muestran que las poblaciones con mayor consumo de flavonoides, principales componentes del propóleos, tienen menor mortandad por enfermedad coronaria (Vargas, *et al.*, 2013). El extracto metanólico presentó una capacidad antioxidante de 93.47 µg/mL, el clorofórmico de 6.17 µg/mL y el hexánico de 403.14 µg/mL. Como control positivo se empleó quercetina. De acuerdo al índice de actividad antioxidante (Scherer y Teixeira, 2009) el extracto metanólico presento una capacidad antioxidante pobre, y el clorofórmico una capacidad antioxidante fuerte ya que se necesita menor cantidad de este para reducir para reducir el DPPH, mientras que el extracto hexánico presento una capacidad antioxidante pobre. Esta actividad depende del contenido de fenoles y flavonoides. Las infecciones fúngicas invasivas del género *Candida*, constituyen una de las principales causas de altos índices de morbilidad y

mortalidad en pacientes inmunocomprometidos y hospitalizados. Para poder colonizar órganos del hospedero humano, estos patógenos requieren de varios factores de virulencia entre los que se encuentra la respuesta al estrés oxidativo (REO). La REO es considerada un factor de virulencia importante debido a que, durante el proceso de infección, las especies de *Candida* tienen que hacer frente a las especies reactivas de oxígeno (ERO), generadas durante el estallido respiratorio (proceso donde algunas células son capaces de producir y liberar especies reactivas de oxígeno) (Balz 1994). En las mismas condiciones en las que se producen las ERO, los organismos producen una serie de biomoléculas de pequeño y elevado peso molecular que actúan como parte de un complejo sistema antioxidante enzimático y no enzimático, que permite mantener la homeostasis del estado redox del organismo. Sin embargo, en situaciones en las que se establece un desbalance entre estos dos mecanismos se produce un estado de estrés oxidativo. Cuando la defensa antioxidante es insuficiente para proteger al organismo del efecto dañino de los radicales libres puede conducir al estrés oxidativo, condición que está estrechamente vinculada a una gran diversidad de patologías. Este desbalance tiene consecuencias citopatológicas que incluyen modificaciones en las proteínas, lípidos y ADN, produciendo lipoperoxidación, oxidación de los grupos sulfhidrilos de las proteínas y fragmentación o formación de enlaces covalentes cruzado en las ribonucleoproteínas, entre otros (Tapia, 2018). Los antioxidantes utilizados en alimentos, previenen o inhiben el desarrollo de la rancidez o la aparición de otros compuestos de deterioro debido a la oxidación. Es probable que este sea también el caso del propóleo, ya que debido a su composición química es una fuente natural de antioxidantes. La capacidad antioxidante del propóleo podría estar relacionada con algunos de sus efectos biológicos. Las sustancias antioxidantes pueden ayudar a proteger el organismo humano o animal contra varios tipos de daños oxidativos, los antioxidantes juegan un papel importante en la patogenia de un número importante de enfermedades (Perea, 2007). Los antioxidantes, pueden formar complejos estables impidiendo la acción catabólica de los radicales libres en la membrana celular (González y Hernández, 2015).

Debido a la composición química del propóleo se procedió a cuantificar el contenido de fenoles y flavonoides. Tras realizar una prueba cualitativa de los tres extractos, la cual resultó negativa para el hexánico. En la cuantificación de fenoles el extracto metanólico presento mayor cantidad de fenoles 430 (mg (e AG) /g) que el extracto clorofórmico 21.94 (mg (e AG) /g). Los constituyentes fenólicos de las plantas conforman uno de los mayores grupos de compuestos que actúan como antioxidantes primarios, entendiéndose como tal que pueden prevenir la formación de nuevos radicales libres, dado que los convierten en moléculas menos perjudiciales antes de que puedan reaccionar o bien, pueden evitar la formación de

radicales libres a partir de otras moléculas; en general, estas propiedades dependen de la habilidad para donar hidrógeno o un electrón a un radical libre (Perea, 2007). En la cuantificación de flavonoides, en el extracto metanólico fue menor la cantidad de flavonoides 15.5103171 (mg (e Q) /g), comparado con el extracto clorofórmico 18.0623974 (mg (e Q) /g (Cuadro 7). Se sabe que el solvente empleado para la extracción influirá en el contenido de fenoles y flavonoides y por lo tanto su capacidad biológica, el hexano por su parte es un solvente no polar y disuelve compuestos apolares como ceras, aceites y resinas (Murga et al., 2000). Los flavonoides retiran oxígeno reactivo especialmente en forma de aniones superóxidos, radicales hidróxidos, peróxidos lipídicos o hidroperóxidos (Martínez et al., 2002).

El contenido de fenoles y flavonoides en los extractos metanólico, clorofórmico y hexánico es muy variable, por lo que se procedió hacer diferentes perfiles químicos, para determinar los compuestos que se encuentran interaccionando y que permitan una comparación. Se realizó una cromatografía líquida de alta resolución, en el caso del extracto metanólico se encontraron principalmente fenoles (flavonoides, ácidos fenólicos y sus ésteres). Las funciones biológicas de los compuestos fenólicos vegetales son muchas y muy variadas entendiéndose desde sustancias odoríferas y pigmentos que atraen a los agentes polinizadores, venenos y disuasorios alimentarios, compuesto alelopáticos, componentes estructurales, agentes antifúngicos y antimicrobiales (Catalán y Montejó, 2006). No fue posible identificar que compuestos exactos, sin embargo, Sales et al., en 2006, determinaron que los ácidos fenólicos como el cafeico, ferúlico, cumárico y cinámico, son comunes en los propóleos, dichas propiedades les proporciona propiedades bactericidas, fungicidas y antivirales. El propóleo se asocia a la defensa de la colmena, sus propiedades protectoras provienen de componentes de las plantas, consta de resinas, ceras volátiles y pólenes de flores, y de acuerdo a estudios bioquímicos también tiene alcoholes, aldehídos, fenólicos, ésteres y ácidos grasos (Salamanca et al., 2007).

En el análisis de HPLC-MS, se obtuvo para el extracto metanólico y los principales flavonoides detectados fueron luteolina, naringenina, kaempferol, pinocembrina, crisina y apigenina. Los flavonoides son productos de gran importancia, ya que son ampliamente distribuidos en el reino vegetal, por eso son tan abundantes en los propóleos. Los flavonoides poseen características antioxidantes, propiedades quelantes, y están asociadas a la prevención de patologías crónicas y enfermedades relacionadas con la edad. Cabe mencionar que la concentración de los flavonoides varía de acuerdo a la estación, la vegetación, clima y relieve (Edreva 2005). La pinocembrina es uno de los flavonoides primarios aislado de la variedad de plantas, su amplia gama de actividades, antimicrobiana, antiinflamatoria,

antifúngica, antioxidante y anticancerígena (Bankova, et al., 2000). Los demás flavonoides detectados tras el análisis tienen reportes previos de su actividad biológica, como se muestran en el cuadro 9.

Respecto a la GC-MS, del extracto hexánico y clorofórmico, como se observa en las figuras 10 y los cuadros 10 y 11 se detectaron polioles, ácidos y otros hidrocarburos. Entre los ácidos se identificaron ácidos carboxílicos como el ácido palmítico, el ácido eicosanóico y el ácido oleico. Estos tienen actividades anticancerígenas, antioxidantes, antimicrobianas, prevención de enfermedades cardiovasculares (Herrera, et al., 2006; Castro, 2002; González, et al., 1999). La presencia de ácidos grasos saturados, insaturados, aromáticos derivados de fenilpropanoides ha sido ampliamente demostrada en muestras de propóleos de diferentes orígenes geográficos (Belmonte, 2018; Park et al., 2002; Rebiai et al., 2017). Dichos trabajos demuestran que la actividad biológica de los propóleos, se debe a su composición química, lo que se debe a que provienen de diferentes regiones geográficas; sin embargo, también puede estar influyendo la época de recolección del propóleo y la especie de la abeja (Quintero et al., 2008). La acción sinérgica de varios compuestos flavonoides en el propóleo mejora la acción de este producto natural (Peña, 2008)

Los beneficios para la salud, así como las actividades biológicas de los propóleos han sido conocidas y utilizados en la medicina popular, contiene sustancias resinosas recolectadas por las abejas, formando así un complejo de sustancias biológicamente activo.

Finalmente se puede dar importancia al solvente empleado para la extracción de un propóleo influye en los compuestos que presentara dicho extracto y su actividad biológica.

IX. CONCLUSIÓN

1. El extracto metanólico presentó la mayor actividad anti-*Candida*
2. En general el extracto metanólico tuvo un efecto fungicida.
3. El extracto metanólico presentó diferentes compuestos fenólicos, como luteolina, naringenina, kaemferol, pinocembrina, crisina y apigenina

REFERENCIAS

- Alburquenque, C., & Tapia, C. (2013). Interacción *Candida albicans*-Hospedero: un proceso complejo en el que la inmunidad innata juega un importante papel. *Boletín Micológico*, 28(2).
- Alburquerque, C., Hermosilla, G., y Tapia, C. (2009). Distribución y susceptibilidad a fluconazol de levaduras del género *Candida* aisladas en pacientes hospitalizados y ambulatorios. *Revista chilena de infectología*, 26(5), 435-439.
- Amaya, R.L.M., Portillo, M.C.I., 2013. Determinación de fenoles y 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 del Salvador, El Salvador, 115.
- Alzate, N. A. G., López, K., Marín, A., Murillo, 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. *Tumbaga*. 1 (4), 59-71.
- Aluyor, E. O., Ori-Jesu, M. 2008. The use of antioxidants in vegetable oils—A review. *African Journal of Biotechnology*, 7(25).
- Bankova, V. S., de Castro, S. L., Marcucci, M. C. 2000. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, 31(1), 3-15.
- Balz, F. (1994). *Natural antioxidants in human health and disease*. Academia Press Inc. New York
- Bakker, M. L., Alvarado, P. I. (2006). Alcanos lineales de la cera cuticular de hojas de *Populus alba*, *Populus deltoides* (*Salicaceae*), *Robinia pseudoacacia* (*Fabaceae*), *Ulmus pumila* (*Ulmaceae*) y *Fraxinus americana* (*Oleaceae*) en Tandil, Buenos Aires, Argentina. *Darwiniana*, 58-63.
- Bedascarrasbure, E., Maldonado, L., Álvarez, A., Rodríguez, E. 2004. Contenido de fenoles y flavonoides del propoleos argentino. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 23, 369-372.
- Belmonte Clemente, L. (2018). El propóleo: suplemento alimenticio como medida terapéutica para el tratamiento de la candidiasis vaginal.
- Blanco, J. L., García, M. E. 2000. Presente y futuro del diagnóstico inmunológico de las micosis animales. *Revista Iberoamericana de Micología: Organó de la Asociación Española de Especialistas en Micología* 17, 23-28.
- Boekhout, T., Gueidan, C., De Hoog, S., Samson, R., Varga, J., Walther, G., 2009. Fungal taxonomy: new developments in medically important fungi. *Current Fungal Infection Reports*. 3 (3), 170-178.

- Boutabet, K., Kebsa, W., Alyane, M., & Lahouel, M. 2011. Polyphenolic fraction of Algerian propolis protects rat kidney against acute oxidative stress induced by doxorubicin. *Indian journal of nephrology*, 21(2), 101.
- Cabrera Rosero, G. C. 2017. *Efectividad in vitro del propóleo sobre *Cándida albicans**. Master's thesis, Quito: Universidad de las Américas.
- Calderone, R.A., y Fonzi, W.A., 2001. Factores de virulencia de *Candida albicans*. *Revista de Tendencias en microbiología*. 9 (7), 327-335.
- Castro-González, M. I. (2002). Ácidos grasos omega 3: beneficios y fuentes. *Interciencia*, 27(3), 128-136.
- Catalán, M., & Montejo, J. C. (2006). Antifúngicos sistémicos. Farmacodinamia y farmacocinética. *Revista iberoamericana de micología*, 23(1), 39-49.
- Carrillo, J. L. R. 2016. La apiterapia en la medicina alternativa.
- Chaverri, C., Ciccío., J., F. 2017. Essential oils of *Baccharis trinervis* (Asteraceae) from Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 65(4), 1307-1321.
- Chen, A. Y., Chen, Y. C. 2013. A review of the dietary flavonoid, kaempferol on human health and cancer chemoprevention. *Food chemistry*, 138(4), 2099-2107.
- Cheng, S.C. 2012. Interplay between *Candida albicans* and the mammalian innate host defense. *Infect. Immun.* 80: 1304-1313.
- CLSI. 2012. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for microbial susceptibility testing; twentieth informational supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Pennsylvania, USA.
- Criado, P., R., Oliveira, C., B., Dantas, K.,C., Takiguti, F.,A., Benini, L.,V., Vasconcellos, C. 2011. Superficial mycosis and the immune response elements. *Ann Bras Dermatology* 86(4) 726-31.
- Cruz, Ch., R., Ponce, E., Calderón, R., L., Delgado, V., N., Viejilla, O., P., Piontelli, L., E. 2011. Superficial mycoses in the city of Valparaíso, Chile: period 2007-2009. *Chilena Infectol* 28(5):404–9.
- Cuesta Rubio, O., Cuéllar Cuéllar, A., Vázquez Cano, A., Iris Ferraz, B., Gil Rodríguez, J., Agüero Agüero, J., Alemán Sánchez, A. 1997. Estudio químico y microbiológico de 2 muestras de propóleo rojo de origen cubano. *Cubana Farmacología*. 31(1), 49-53.
- da Silva Frozza, C. O., Garcia, C. S. C., Gambato, G., de Souza, M. D. O., Salvador, M., Moura, S. Dellagostin, O. A. 2013. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. *Food and chemical toxicology*, 52, 137-142.

- Davis B.D., Dulbecco R. 1996. Tratado de microbiología, 3° ed. Ed. Salvat. Editores España, 285.
- de Bedout, C., Ayabaca, J., Vega, R., Méndez, M., Santiago, A. R., Pabón, M. L., Newell, V. 2003. Evaluation of *Candida* species' susceptibility to fluconazole with the disk diffusion method. *Biomedica*, 23(1), 31-7.
- del Valle, G. M. M. 2015. *Candida glabrata*: un patógeno emergente. *Biociencias*, 10(1), 89-102.
- Dominguez, X.A., 1973. 1973. Metodos de Investigación Fitoquímica (1ra Edición). Limusa. México. 3-17
- Edreva, A. (2005). Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: a submolecular approach. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 106(2-3), 119-133.
- Fernández P. M., Blanco M. A., Mora U. J., 1995. Contenido de ácidos grasos en cuatro poblaciones de pejibaye, *Bactris gasipaes* (Palmae). *Revista de biología tropical*, 61-66.
- Fidel, P. L., Vazquez, J. A., Sobel, J. D. 1999. *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clinical microbiology reviews*, 12(1), 80-96.
- Freires, I. A., Queiroz, V. C. P. P., Furletti, V. F., Ikegaki, M., de Alencar, S. M., Duarte, M. C. T., Rosalen, P. L., 2016. Chemical composition and antifungal potential of Brazilian propolis against *Candida* spp. *Journal de mycologie medicale*. 26 (2), 122-132.
- Gadea, I., Cuenca-Estrella, M., Martín, E., Pemán, J., Pontón, J., & Rodríguez-Tudela, J. L. 2007. Procedimientos de diagnóstico microbiológico de las micosis y estudios de sensibilidad a los antifúngicos. *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica*, 25(5), 336-340.
- García, A., Ucar, A., Ballester, L. 2014. Eliminación de *Candida albicans* con extracto etanólico de propóleo comercial de *Apis mellifera* del estado Mérida, en bases de prótesis parciales removibles. *Revista Odontológica de los Andes*. 9 (1), 4-14.
- García M. E., Blanc J. L. 2000. Principales enfermedades fúngicas que afectan a los animales domésticos, Laboratorio de Micología Clínica. *Rev Iberoamericana Micología*. Departamento de Patología Animal I (Sanidad Animal). Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, Madrid, España (17: S2-S7)
- Gómez Ugarte, M., Reyes Rojas, S., Paredes Choque, L. (2015). La manzanilla y sus propiedades medicinales. *Revista de Investigación e información en Salud*, 10, 54.

- González, F. O. C., Gancedo, J. C. B., Suárez, R. A. (1999). Study of the density and viscosity of some pure fatty acids. *Grasas y Aceites*, 50(5), 359-368.
- Grajales-Conesa, J., Meléndez-Ramírez, V., Cruz-López, L. 2011. Aromas florales y su interacción con los insectos polinizadores. *Revista mexicana de biodiversidad*, 82(4), 1356-1367.
- Guarro, J., 2012. Taxonomía y biología de los hongos causantes de infección en humanos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 30 (1), 33-39.
- Gutiérrez, A., Ortiz, G., Mendoza, C., 2008. Medición de fenoles actividad antioxidante en malezas usadas para alimentación animal. Simposio de Metrología. Universidad Autónoma de Querétaro. 1-5.
- 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. *Horizonte Médico*. Perú. 15 (1) 57-60.
- Gurib-Fakim, A., 2006. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*. 27 (1):1-93.
- Harborne, A. J. 1998. *Phytochemical methods a guide to modern techniques of plant analysis*. springer science & business media.
- Herrera, C. L., Alvear, M., Barrientos, L., Montenegro, G., & Salazar, L. A. 2010. The antifungal effect of six commercial extracts of Chilean propolis on *Candida* spp. *Ciencia e investigación agraria*, 37(1) 75-84.
- Herrera, M. C., Vega, S., Tolentino, R. G., Fernández, B. G., & González, G. D. 2006. Los ácidos grasos omega-3 y omega-6: nutrición, bioquímica y salud. *Revista de Educación Bioquímica*, 25(3) 72-79.
- Joya, M., Gil, M., Bastidas-Pacheco, G., 2017. Actividad fungistática y fungicida de extractos etanólicos de propóleos sobre el crecimiento in vitro de cepas del género *Candida*. *Revista Tecnología en Marcha*. 30 (3) 3-11.
- Kalita, P., Barman, T., Pal, T., 2013. Estimation of total flavonoids content (TFC) and antioxidant activities of methanolic whole plant extract of *Biophytum sensitivum* Linn. *Journal of Drug Delivery & Therapeutics*. 3(4) 33-37.
- Koneman, E. W., Allen, S. D., Dowell, V. R., Sommers, H. M., 1985. Diagnóstico microbiológico. Ed. Médica Panamericana, México. 909.
- Kumazawa, S., Hamasaka, T., Nakayama, T., 2004. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry Journal*. 84, 329-339.
- Leiva, A., 2017. Principios de funcionamiento del rotavapor. SCRIBD. 1-2

- Lima, B., Tapia, A., Luna, L., Fabani, M. P., Schmeda-Hirschmann, G., Podio, N. S., ... & Feresin, G. E. (2009). Main flavonoids, DPPH activity, and metal content allow determination of the geographical origin of propolis from the province of San Juan (Argentina). *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(7), 2691-2698.
- Londoño-Orozco, A., Pinieres-Carrillo, J. G., García-Tovar, C. G., Carrillo, L., Quintero-Mora, M. L., García-Vásquez, S. E., Mendoza-Saavedra, M. A. 2008. Estudio de la actividad antifúngica de un extracto de propóleo de la abeja *Apis mellifera* proveniente del estado de México. *Revista Tecnología en Marcha*. 21(1) 49-55.
- López, A. S., Subovsky, M., Maidana, J. F., & Castillo, A. 2003. organoleptic and physical characteristics of propolis from Northeastern Argentina. *Spanish journal of agricultural research*, 1(2) 37-40.
- Manrique, A. J., 2006. Actividad antimicrobiana de propóleos provenientes de dos zonas climáticas del estado Miranda, Venezuela. Efecto de la variación estacional. *Zootecnia Tropical*. 24(1), 43-53.
- Manrique, A. J., Santana, W.C., 2008. Flavonoides, actividades antibacteriana y antioxidante de propóleos de abejas sin aguijón, *Melipona quadrifasciata*, *Melipona compressipes*, *Tetragonisca angustula* y *Nannotrigona sp.* de Brasil y Venezuela. *Zootecnia Tropical*. 26, 157-166
- Martínez-Flórez, S., González-Gallego, J., Culebras, J. M., Tuñón, M. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr Hosp*, 17(6), 271-278.
- Mayer, F. L., Wilson, D., & Hube, B. (2013). *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*, 4(2), 119-128.
- McVean, M., Xiao, H., Isobe, K. I., & Pelling, J. C. 2000. Increase in wild-type p53 stability and transactivational activity by the chemopreventive agent apigenin in keratinocytes. *Carcinogenesis*, 21(4) 633-639.
- Mejía A. M. A., Santa V., C. A. T. A. L. I. P. N. A., Cadavid S. M. A. N. U. E. L. A., Vélez, L., Colmenares, L., Restrepo J. B. N., Cardona C. N. O. R. A. 2013. Etiological and epidemiological study on superficial mycoses performed in a referral laboratory center-Antioquia-Colombia. *CES Medicina*, 27(1) 7-19.
- Mirzoeva, O. K., Grishanin, R. N., Calder, P. C. 1997. Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. *Microbiological research*, 152(3) 239-246.
- Muñoz, O., Peña, R. C., Ureta, E., Montenegro, G., Caldwell, C., & Timmermann, B. N. (2001). Phenolic compounds of propolis from central Chilean matorral. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 56(3-4), 273-277.

- Murga, R., Ruiz, R., Beltrán, S., Cabezas, J. L. 2000. Extraction of natural complex phenols and tannins from grape seeds by using supercritical mixtures of carbon dioxide and alcohol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(8) 3408-3412.
- Morón, R. F. J., Jardines, M., J. B., 1997. La medicina tradicional en las universidades médicas. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 2(1) 35-41
- NORMA Oficial Mexicana NOM-003-SAG/GAN-2017, Propóleos, producción y especificaciones para su procesamiento. *Diario Oficial de la Federación*. No. 6. 6 de octubre 2017. 27-35 pp.
- OMS (Organización Mundial de la Salud). 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 gilleti* De Wild (Boraginaceae). *Journal of Ethnopharmacology*. 112 476-481.
- Ozyurt, B., Gulec, M., Ozyurt, H., Ekici, F., Atis, O., Akbas, A. 2006. The effect of antioxidant caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on some enzyme activities in cisplatin-induced neurotoxicity in rats. *Eur J Gen Med*, 3(4) 167-172.
- Park, Y. K., Alencar, S. M., Aguiar, C. L. 2002. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(9) 2502-2506.
- Paula, V. B. (2012). *Caraterização química e biológica do própolis da “serra de Bornes” por TLC* (Doctoral dissertation, Instituto Politécnico de Bragança, Escola Superior Agrária).
- Pedraza C. J., Cárdenas R. N., Orozco I. M., Pérez R. J. M. 2008. Medicinal properties of mangosteen (*Garcinia mangostana*). *Food and chemical toxicology*, 46(10) 3227-3239.
- Peña, R. C. 2008. Propolis standardization: a chemical and biological review. *Ciencia e Investigación Agraria*, 35(1) 11-20.
- Perea, E. M. (2007). Actividad antioxidante in vitro y antimicrobial de extractos metanólicos de cuatro albahacas cultivadas en Ibagué. *Revista Tumbaga*, 2(1).
- Pérez, J., y Carrasco. 2000. Diagnóstico histopatológico de micosis en patología veterinaria Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas. Facultad de Veterinaria. Córdoba. *Revista Iberoamericana Micología*. 17 18- 22
- Quintero-Mora, M. L., Londoño-Orozco, A., Hernández-Hernández, F., Manzano-Gayosso, P., López-Martínez, R., Soto-Zárate, C. I., Cruz-Sánchez, T. A., 2008. Efecto de extractos de propóleos mexicanos de *Apis mellifera* sobre el crecimiento in vitro de *Candida albicans*. *Revista Iberoamericana de Micología*. 25(1) 22-6.

- Ramamoorthy, P., Bono, A., 2007. Antioxidant activity, total phenolic and flavonoid content of *Morinda citrifolia* fruit extracts from various extraction processes. *Journal of Engineering Science and Technology*. 2(1) 70-80.
- Ramírez, G. V., Marín, Q. M. E., Morales, J., E., Matos, H., N., 2012. Conocimiento y aplicación de la medicina natural y tradicional por profesionales y técnicos de la salud. *Revista Cubana de Estomatología*. 49 (2) 89-98
- Raton, J. A., Aguirre, A., & Díaz-Pérez, J. L. 1990. Contact dermatitis from propolis. *Contact dermatitis*, 22(3) 183-184.
- Rebiai, A., Lanez, T., Belfar, M. L. 2011. In vitro evaluation of antioxidant capacity of algerian propolis by spectrophotometrical and electrochemical assays. *International Journal of Pharmacology*, 7(1) 113-118.
- Rivera Y.C.R., 2010. Actividad antimicrobiana y toxicidad general de *Rosa centifolia* L. Tesis de Licenciatura. UNAM. 65.
- Romeu, C., Pino, J., & Martí, M. P. 2004. Algunas consideraciones acerca de la composición química del aceite esencial de *Lanata camara* presente en Cuba. *Fitosanidad*, 8(3), 59-63.
- Salamanca Grosso, G., Correa Carvajal, I. L., & Principal, J. (2007). Perfil de flavonoides e índices de oxidación de algunos propóleos colombianos. *Zootecnia Tropical*, 25(2), 95-102.
- Sales, A., Alvarez, A., Areal, M. R., Maldonado, L., Marchisio, P., Rodríguez, M., & Bedascarrasbure, E. (2006). The effect of different propolis harvest methods on its lead contents determined by ET AAS and UV-visS. *Journal of hazardous materials*, 137(3), 1352-1356.
- San Martín, A., Chu, G., S Romero, A., Acebey, R., Blanco, E., Flores, Y., Almanza, G.R. 2017. Luteolina en cáscaras de cacahuets (*Arachis hypogaea*) en cultivares de Bolivia. *Revista Boliviana de Química*
- Scherer, R., Godoy, H. T. 2009. Antioxidant activity index (AAI) by the 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food chemistry*, 112(3) 654-658.
- Schelz, Z., Molnar, J., Hohmann, J., 2006. Actividades antimicrobianas y antiplasmid de los aceites esenciales. *Fitoterapia*, 77 (4) 279-285.
- Silva, C. V., Bomfim, F. C. C., dos Santos, M. A. V., Velozo, E. S. 2014. Phytochemical study and in vitro evaluation of the anti-*Trypanosoma cruzi* y strain activity of *Pilocarpus spicatus* A. St. Hil. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 16(4) 812-818.
- Singleton, V., Orthofer, R., Lamuela-Reventós, R., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu Reagent. *Methods in Enzymology*. 299 152-178.

- Tapia Manrique, E. R. (2018). Composición química, actividad antioxidante y antiCandida albicans del aceite esencial de Clinopodium pulchellum (Kunth) Govaerts “panizara”.
- Thammana, M., 2016. A Review on High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Research & Reviews: Journal of Pharmaceutical Analysis. 5 (2) 22-28.
- Tobaldini V. F. K., Bonfim M. P. S., Rosseto, H. C., Bruschi, M. L., Henriques, M., Negri, M., Svidzinski, T. I., 2016. Propolis: a potential natural product to fight *Candida* species infections. Future microbiology. 11 (8) 1035-1046.
- Tolosa, L., Cañizares, E., 2017. Obtención, caracterización y evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos de Campeche. Ars Pharmaceutica, 43(1-2) 187-204.
- Pérez, J., Carrasco, L. 2000. Diagnóstico histopatológico de micosis en patología veterinaria Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas. Facultad de Veterinaria. Córdoba. Rev Iberoam Micol 17 18-22
- Vargas, S. R. D., Torrescano, U., G. R., Sánchez E., A., 2013. El propóleo: conservador potencial para la industria alimentaria. Interciencia, 38(10).
- Verdugo Torres, M. A., Álvarez, T., Esteban, B. 2017. Capacidad antioxidante y composición química de varios extractos de propóleos de la zona sur del Ecuador (Master's thesis).
- Zhang, T., Omar, R., Siheri, W., Al Mutairi, S., Clements, C., Fearnley, J., Watson, D. 2014. Chromatographic analysis with different detectors in the chemical characterization and dereplication of African propolis. Talanta, 120 181-190.
- Zubair, M., Hassan, S., Rizwan, K., Rasool, N., Riaz, M., Zia-UI-Haq, M., De Feo, V. 2013. Potencial antioxidante y composición del aceite de las hojas de *Callistemon viminalis*. The Scientific World Journal.