

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y LA SALUD
ANIMAL

**“Evaluación de la actividad antimicótica *in vitro* de propóleo
procedente de abeja nativa *Scaptotrigona mexicana* contra
Microsporium canis”.**

T E S I S

PARA OPTAR POR EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y LA SALUD ANIMAL

P R E S E N T A

MARYSOL CARMONA CHÁVEZ

ASESOR

DR. TONATIUH A. CRUZ SÁNCHEZ

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

DR. JOSÉ GUILLERMO PENIERES CARRILLO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

DRA. MARÍA MARGARITA CANALES MARTÍNEZ

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

CUAUTITLÁN IZCALLI ESTADO DE MÉXICO, 2023





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.

FINACIAMIENTO

Proyecto PAPIIT IN223719 “Evaluación de la potencialidad antimicrobiana de propóleos de abejas sin aguijón de México”

-Proyecto PIAPI 2011: Investigación del propóleo de abejas nativas (abejas sin aguijón) para su aplicación en Medicina Veterinaria y Humana

-Beca Conacyt CVU 966537

CÁTEDRAS DE INVESTIGACIÓN

CI2237

“Potencialización de la actividad biológica de propóleos con la adición de chalconas para su aplicación en la salud animal y humana”

C12222

Nanopartículas de propóleos de abejas nativas provenientes de Chiapas para su aplicación en medicina veterinaria

LUGARES DE REALIZACIÓN

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM

Laboratorio No. 6 de la Unidad de investigación Multidisciplinaria, FES-UNAM, “Laboratorio del Servicio de Análisis de Propóleos” bajo la responsabilidad del Dr. Tonatiuh A. Cruz Sánchez.



Instituto de Química

Laboratorio de Espectrometría de Masas con el apoyo de Dr. Francisco Javier Pérez Flores.

Este trabajo se presentó en el XXVI Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias 2021



Agradecimientos

Este trabajo lo logré gracias a la presencia y ayuda de muchas personas que me han ayudado a crecer como persona y profesionalmente, doy gracias a la vida haberme encontrado con todos ustedes.

Dr. Tonatiuh gracias por seguir creyendo en mi como investigadora y dejarme ser parte del LASAP que más que un equipo de trabajo se ha formado una bella familia.

Dra. Betsabé que aparte de ser una ayuda durante todo mi proceso me has brindado una amistad incondicional que valorare por el resto de mi vida.

A los doctores miembros de mi comité Dra. Margarita Canales y Dr. José Guillermo Penieres gracias por todo su apoyo y consejos dados durante el proceso.

Especial mención a todos los que me ayudaron en la parte técnica sin todos ustedes no lo hubiera logrado: Biol. Elva Bazán, Dr. Carlos Gerardo García, M en C. Francisco Rodolfo González Díaz, QFB Arianna Lezama Uc .

Y por último quiero agradecer a mi familia que siempre están en mi mente y corazón durante el proceso y a todos mis amigos que me apoyaron y me estuvieron echando porras

CONTENIDO

1. SÍNTESIS	7
2. INTRODUCCIÓN	8
2.1 ABEJAS SIN AGUIJÓN O NATIVAS	8
2.2 PROPÓLEO	12
2.2.1 Composición química del propóleo	12
2.2.2 Propiedad antimicótica del propóleo.....	14
2.3. HONGOS	14
2.4 DERMATOFITOSIS.....	19
2.4.1 Diagnóstico	20
2.5 <i>MICROSPORUM CANIS</i>	22
2.6 ANTIMICÓTICOS	24
2.6.1 Azoles: imidazoles y triazol	24
2.6.2 Ketoconazol	26
2.7 ANTECEDENTES DEL USO DE PROPÓLEO EN CANINOS	28
2.7.1 Neoplasias	28
2.7.2 Microorganismos.....	28
2.7.3 Inmunoestimulante.....	28
2.7.4 Oftalmopatías.....	29
2.7 HERRAMIENTAS PARA EL ESTUDIO ESTRUCTURAL DE <i>MICROSPORUM CANIS</i>	31
3. JUSTIFICACIÓN	32
4. HIPÓTESIS	33
5. OBJETIVO GENERAL.....	34
5.1 OBJETIVOS PARTICULARES.....	34
6. DISEÑO EXPERIMENTAL (FIGURA 9)	35
7.1 PROPÓLEO	36
7.1.1 Especificaciones físicas	37
7.1.2 Pruebas cualitativas de EEP.....	38
7.1.3 Pruebas cuantitativas de EEP	38
7.1.4 Cromatografía de gases masa.....	39
7.2 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA.....	39
7.2.1 Prueba de sensibilidad cualitativa	39
7.2.2 Prueba de difusión en agar.....	41
7.2.3 Método de dilución de 24 pozos.....	42
7.2.4 Determinación del daño celular.....	42
8. RESULTADOS.....	44
8.1 PROPÓLEO	44
8.1.1Especificaciones físicas	44
8.1.2Pruebas cualitativas	45
8.1.3 Pruebas cuantitativas.....	46
8.1.4 Cromatografía de gases masa.....	47

8.2 PRUEBA DE SENSIBILIDAD CUALITATIVAS	50
8.2.1 Prueba de difusión en agar.....	50
8.3 PRUEBA DE SENSIBILIDAD CUANTITATIVA	51
8.3.1 Método de 24 pozos en agar modificado	51
8.3.2 Daño celular.....	52
9. DISCUSIÓN	57
10. CONCLUSIONES	60
12. REFERENCIAS	61

TABLAS

Tabla 1 Perspectivas del uso de propóleo <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> (Tovar, 2016)	30
Tabla 2 Especificaciones físicas del propóleo	37
Tabla 3 Características físicas del propóleo empleado.....	44
Tabla 4 . Resultados de la muestra de extracto de propóleo que muestra la absorbancia y la concentración de fenoles del analito.	46
Tabla 5 . Medición de ancho de hifas (micras) y promedios, (Se observa la gran diferencia comparando el grupo control el cual tiene un ancho promedio de 2.4 micras a comparación del grupo de EEP a 512 mg/ml con 8.3 micras) y el grupo control el cual no tenía ningún tratamiento	54

FIGURAS

Figura 1 Mapa de registros de <i>Melipona beecheii</i> y <i>Scaptotrigona mexicana</i> en México. (Shanahan <i>et al</i> 2017)	8
Figura 2 Diferencias entre abejas sin aguijón y con aguijón (Shanahan, <i>et al</i> , 2017)	9
Figura 3. Características de <i>Scaptotrigona mexicana</i> (Shanahan 2017)	10
Figura 4 Códice maya en donde se representa a las abejas. (Arnold, <i>et al</i> , 2018)	11
Figura 5 Productos principales de la colmena (Shanahan, 2017)	12
Figura 6. Esquema de hongos pluricelulares y unicelulares (Reynosa, <i>et al</i> , 2015)	16
Figura 7. Colonia <i>Microsporium canis</i> tomada en LASAP FESC	18
Figura 8 Lesiones dermatológicas ocasionadas por <i>Microsporium canis</i> en caninos (Reynosa, <i>et al</i> ,2015)	23
Figura 9 Diseño experimental	35
Figura 10. Georreferencia del propóleo	36
Figura 11 vista microscópica de macroconidias con tinción de azul de algodón	41
Figura 12 . Cepa de <i>M.canis</i> en agar SDA con 10 días	41
Figura 13 Vista macroscópica del propóleo Figura 11.1 Vista macroscópica del propóleo	44
Figura 14. Prueba cualitativa del propóleo mezcla sin el reactivo	45

Figura 15. Reacción a los componentes	45
Figura 16. Curva de calibración para obtener la concentración de ácido gálico en la muestra de propóleo. Se muestra también los valores de absorbancia (Abs en nm).	46
Figura 17. Curva de flavonoides y totales	47
Figura 18 Cromatograma de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) correspondiente al propóleo de <i>Scaptotrigona mexicana</i> y los principales compuestos detectados.	49
Figura 19. Prueba de difusión radial con extracto etanólico de propóleo, concentraciones de 16 mg (A), 32 mg (B), 64 mg (C) y 128 mg (D) , así como con ketoconazol 50 mg (E).	50
Figura 20. Prueba de 24 pozos en agar SDA se puso la muestra por triplicado se muestra en las filas de izquierda a derecha: concentración 128 mg, 256 mg, 512 mg, ketoconazol y grupo control. Se observa el crecimiento de la cepa de <i>M.canis</i> desde el día a) 0, b)5, c)15 y d) hasta el 30 .	51
Figura 21 Tinción azul de algodón, cambio de hifas 24 horas después de aplicar las concentraciones de EEP A) Control, (hifas sin cambio)B) Ketoconazol (Hifas adelgazadas)50 mg/ml, C) 256 mg/ml, D) 128 mg/ml, E)512 mg/ml (hifas ensanchadas) (vista 100 X)	53
Figura 22. Promedio de ancho de hifas, prueba de ANOVA empleando un nivel de significancia de $P < 0.05$, observando que las hifas tratadas con el EEP a 512 mg/ml (+++) tuvieron un ensanchamiento significativo comparado con las hifas control y las hifas tratadas con ketoconazol	54
Figura 23. Imágenes tomadas con microscopio de fluorescencia. En el grupo control (A) podemos observar una hifa sin daño (flecha roja), en el grupo de Ketoconazol (E) podemos observar al enfocar con el yoduro de propidio como se marca de rojo el interior de la hifa lo cual nos demuestra que el ketoconazol logro entrar a la hifa debido a la ruptura de la membrana, en los 3 grupos en donde se utilizó el EEP a diferentes concentraciones en el 128 mg/ml (I) observamos vacuolas y que el yoduro logro entrar a la hifa , en el de 252 mg/ml (L) observamos lo mismo que en la concentración anterior y las vacuolas más grandes y definidas y en la concentración 512 mg/ml (Ñ) observamos adelgazamiento y ruptura de las hifas (Flecha azul)	56

1. SÍNTESIS

El objetivo de este trabajo fue evaluar *in vitro* el propóleo de abeja nativa de la especie *Scaptotrigona mexicana*, en base a la observación de diversos trabajos de sus propiedades antifúngicas, antivirales y antibacterianas, entre otras.

Se obtuvo extracto etanólico de propóleo proveniente de Yecuatla Veracruz y se trabajó con una cepa de *Microsporum canis* proporcionada por Facultad de Medicina UNAM.

Se evaluó la actividad antifúngica mediante la prueba cualitativa de difusión en agar Sabouraud utilizando discos impregnados de EEP a las siguientes concentraciones: 16 mg, 32 mg, 64 mg y 128 mg/ml, encontrando inhibición únicamente en la concentración de 128mg/ml

También se realizó el método cuantitativo de 24 pozos en agar modificado, utilizando concentraciones de 128 mg, 256 mg y 512 mg/ml obteniendo una alta inhibición a partir de la concentración de 128 mg. En las dos pruebas realizadas se utilizó como control ketoconazol a una dosis de 50mg y un control positivo con *M.canis*.

Posteriormente se evaluó el daño celular observando con tinción de azul de algodón, en las concentraciones de extracto etanólico de propóleo (EEP) 128 mg/ml, 256 mg/ml, 512 mg/ml; 50 mg/ml de ketoconazol y un control, observando un ensanchamiento marcado de las hifas en la concentración más alta utilizada de EEP 512 mg/ml.

También se evaluó el daño estructural mediante microscopia de fluorescencia observando un ensanchamiento y ruptura de las hifas en todas las concentraciones utilizadas (128, 256 y 512 mg/ml), comparando con el grupo utilizado con ketoconazol el cual adelgazó la hifa.

Por lo cual observamos se puede utilizar el EEP como un co-tratamiento en las infecciones causadas por *M. canis*

Palabras clave

Propóleo, *Scaptotrigona mexicana*, dermatofitosis, *Microsporum canis*, hongos, piel, antimicótico.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Abejas sin aguijón o nativas

Las abejas llamadas comúnmente “abejas sin aguijón” pertenecen a la tribu *Meliponini*. Aunque se les llama “abejas sin aguijón”, estas abejas sí lo tienen. Sin embargo, su aguijón es muy pequeño y no pueden picar, se encuentran en el continente americano, Asia, África y Oceanía. Viven en zonas tropicales y subtropicales de donde son nativas. En tiempos prehispánicos, cuando la *Apis mellifera* todavía no había llegado a América, las abejas sin aguijón eran las únicas que producían miel. (Morales, 2015)

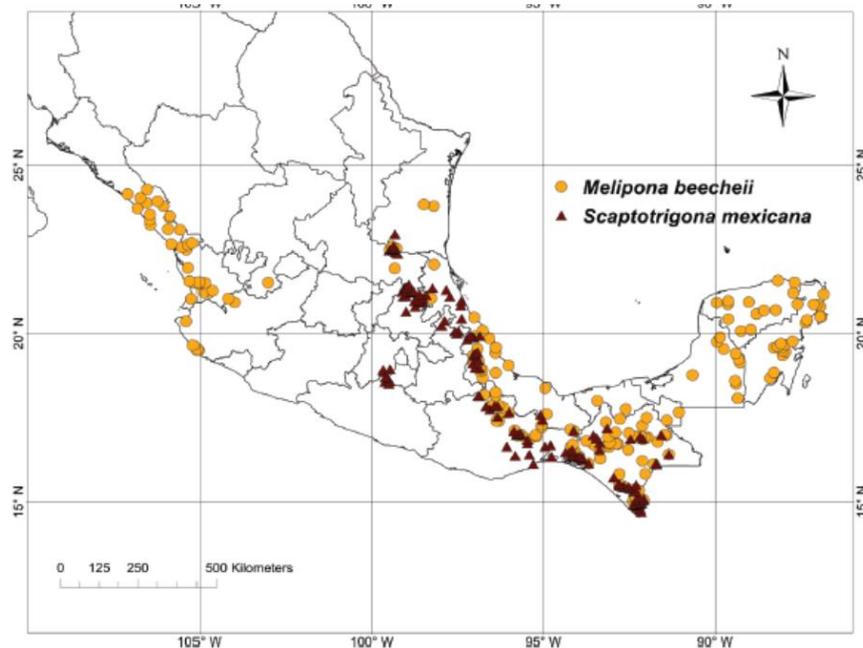


Figura 1 Mapa de registros de *Melipona beecheii* y *Scaptotrigona mexicana* en México. (Shanahan et al 2017)

En el mundo hay unas 20 mil especies de abejas; cerca de 500 habitan en América

En México (Figura 1), están presentes 11 géneros y 46 especies de la Tribu *Meliponini*, los géneros que presentan mayor número de especies son *Plebeia* (12 spp), *Trigona* (9 spp), *Melipona* (7 spp), y *Trigonisca* (5 spp), existen regiones, como en la Huasteca, en donde aprovechan la especie *Scaptotrigona mexicana* En la región de las Altas Montañas del estado de Veracruz existen tres especies de abejas sin aguijón, incluida *Scaptotrigona mexicana*, con alto potencial para ser explotadas comercialmente, además de: *Scaptotrigona pectoralis* y *Nannotrigona perilampoides*. (Ayala, 1999)



Figura 2 Diferencias entre abejas sin aguijón y con aguijón (Shanahan, et al, 2017)

Para los mayas y nahuas dedicados a la meliponicultura, las especies *Melipona beecheii* y *Scaptotrigona mexicana*, respectivamente, tienen un gran valor cultural por las propiedades nutricionales, medicinales y comerciales de su miel. (González, 2012).

La miel y el propóleo de *Scaptotrigona mexicana* sirve para combatir problemas respiratorios como la tos y malestares del estómago, así como cicatrizante de heridas. Los mayas (Figura 2), por su lado, están convencidos de que la miel de *Melipona beecheii* ayuda a curar las afecciones de los ojos.

Se considera que el propóleo y la miel de *Scaptotrigona mexicana* (Figura 3) es más nutritiva que la de la europea *Apis mellifera*. (Mohd, et al, 2019)

<p>Nombre científico</p>	 <p><i>Scaptotrigona mexicana</i></p>
<p>Nombres comunes en México</p>	<p>Abeja Congo, Pisil Nekmej</p>
<p>Características principales</p>	<p>Su comportamiento varía de ser mansa a ser más defensiva. Se enreda en el pelo para defender su nido. En general, es una abeja resistente a las plagas, como la mosca parásita.</p>
<p>Piquera</p>	
<p>Nidos tradicionales</p>	
<p>Producción anual de miel por colmena (en el sur de Chiapas)</p>	<p>De 0.5 a 1 litro</p>

Figura 3. Características de *Scaptotrigona mexicana* (Shanahan 2017)

En el mundo entero hay cada vez menos abejas sin aguijón. Esta disminución se debe a varias amenazas como, por ejemplo, la deforestación, el uso indiscriminado de pesticidas y el cambio climático.

Por varios motivos, en las últimas décadas el manejo de las abejas sin aguijón también se ha estado perdiendo. Sin embargo, recientemente ha nacido nuevo interés por la meliponicultura (crianza de abejas meliponas o abejas sin aguijón), por las diferentes mieles que brinda y por la importancia cultural que representa, ya que nuestros antepasados utilizaban los subproductos de la colmena para uso medicinal principalmente e incluso las representaban en sus códices (Figura 4)

A pesar de las amenazas (o los riesgos) señalados antes se reconoce su importancia cultural y función polinizadora, por lo que es necesario fomentar el conocimiento y cuidado de las abejas. (Guzmán, 2018)



Figura 4 Códice maya en donde se representa a las abejas. (Arnold, et al, 2018)

2.2 Propóleo

La palabra propóleo viene del griego “propoleo”, que significa pro=adelante y polis= ciudad.

El propóleo es una mezcla resinosa que las abejas obtienen de los árboles que luego procesan en la colmena para sellar los pequeños huecos del nido, (Figura 5) debido a que combate a los microorganismos o evita que aparezcan, el propóleo protege la colonia de enfermedades.

Su color puede parecerse a ocre, rojo, pardo, marrón claro o verde, algunos son friables y firmes, mientras que otros son gomosos y elásticos. Etimológicamente el término proviene del griego y significa en “defensa de la colmena”. (Peña, 2008).



Figura 5 Productos principales de la colmena (Shanahan, 2017)

Las propiedades biológicas y farmacológicas más estudiadas son aquellas que lo describen como agente antiinflamatorio, antioxidante, antiséptico y antineoplásico. (Cruz, *et al*, 2013).

2.2.1 Composición química del propóleo

Básicamente se compone de un 50-55% de resinas y bálsamos, 30-40% de cera de abeja, 5-10% de aceites esenciales o volátiles, 5% de polen, y 5 % de materiales diversos. Se han identificado más de 160 compuestos, de los cuales un 50% son fenólicos, a los cuales se les atribuye acción farmacológica. Los principales son; flavonoides, ácidos aromáticos, y sus esteres, aldehídos aromáticos (vainilla e isovainilla), cumarinas, triglicéridos fenólicos.

En el mundo existe una gran diversidad en cuanto a vegetación, la cual genera variabilidad en la composición química del propóleo. En este sentido, se ha reportado en la composición química del propóleo de diferentes regiones geográficas, y en el caso del propóleo de Europa, China y Norte América predominan compuestos tales como flavonoides, ácidos fenólicos y sus ésteres, mientras que, en propóleos de regiones más tropicales como Brasil, predominan diterpenos, lignanos, y compuestos prenilados derivados del ácido p-cumárico, terpenos y acetofenonas.

Los orígenes principales de los compuestos presentes en la resina de los propóleos son: sustancias secretadas por las plantas y sustancias exudadas de heridas en plantas (material lipofílico en hojas y troncos, resinas, mucílago, gomas, látex, entre otros) colectado por las abejas, sustancias secretadas del metabolismo de las abejas, y material introducido durante la elaboración del propóleo.

Hay distintas estrategias para conocer la fuente de la cual las abejas colectan las resinas para fabricar el propóleo, una de ellas es la comparación de los compuestos químicos del propóleo y en las plantas ubicadas en un radio cercano a la colmena de donde las abejas colectan.

Los métodos químico-analíticos más utilizados para determinar la composición química del propóleo, así como de las resinas de las plantas ha sido la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés), espectrometría de masas (MS) y resonancia magnética nuclear (RMN). (Peña, 2008)

Otras alternativas son estudios anatómicos del propóleo en los que se busca detectar fragmentos de plantas y compararlos con referencias de preparaciones histológicas como posibles fuentes de plantas de las cuales las abejas colectan; exámenes microscópicos de granos de polen encontrados en el propóleo; observación de las abejas para monitorear cuales plantas son las que más visitan para obtener las resinas.

De todos estos métodos la estrategia químico-analítica es la de mejor elección, porque además de proporcionarnos la posible fuente de los exudados, nos proporciona la composición química del propóleo para estandarizar este producto.

Las principales especies de plantas de las cuales proviene el propóleo son especies del género *Populus spp.* (*Populus nigra*, *Populus alba*, *Populus fremontii*, *Populus tremula*, *Populus suaveolens*, etc.), y especies como *Baccharis dracunculifolia*, *Hyptis divaricata*,

Clusia minor, *Clusia major*, *Clusia rosea*, *Dalbergia ecastophyllum*, *Pinus spp*, *Betula spp*, etc. Es importante notar, que en general, las abejas utilizan solo una especie de planta en el área de colecta como fuente principal de resinas para la fabricación del propóleo. (Robles, *et al.*, 2012).

2.2.2 Propiedad antimicótica del propóleo

Las propiedades antimicóticas de propóleo, incluyendo la actividad sobre varias especies de hongos y levaduras como *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Microsporium* y *Malazessia pachidermatis* se han estudiado previamente.

La actividad antimicótica depende del origen del propóleo y del solvente usado para su extracción. (Oliveira *et al.*, 2006).

La recomendación general es realizar un estudio de costo beneficio, considerando que la aplicación de terbinafina y fluconazol en humanos, tienen baja confiabilidad y efectividad antimicótica, ya que sólo un cuarto de los pacientes reacciona bien a la terapia vía oral con estos compuestos antimicóticos (Roberts *et al*, 2003). Además de determinar el costo se hace necesaria la búsqueda de nuevas alternativas (Bristow, 2005).

2.3. Hongos

El reino biológico de los *Fungi* está compuesto por especies diferentes cuyo hábitat natural es el agua, los suelos y los restos orgánicos en descomposición.

Los hongos difieren de manera significativa de las bacterias, son organismos eucariotas y poseen un núcleo definido rodeado por una membrana nuclear y organelos citoplasmáticos.

Los hongos son miembros multicelulares o unicelulares heterotróficos, en los que falta la diferenciación en raíces, tallo u hojas, y se conocen por talofitas (es decir, que poseen talo).

Se diferencian de las algas por su carencia de clorofila, y de las bacterias por su mayor tamaño y su estructura más compleja.

Los hongos son saprófitos o parásitos obligados, cuyos requerimientos nutritivos son similares a los de las bacterias. Son aerobios estrictos o facultativos, y crecen en un amplio margen de temperatura (2 - 50°C) y de pH (1 a 8). (Reynosa *et al*, 2015)

Formas de crecimiento

Los hongos crecen en la naturaleza en dos formas fundamentales:

1. Levaduras (unicelulares)
2. Mohos (formas miceliares)

Formas miceliares

Son la forma multicelular de crecimiento de un hongo.

La unidad estructural fundamental son tubos o filamentos llamados hifas, que se pueden dividir en cadenas de células por la formación de paredes transversales, o tabiques, o presentarse en forma continua, en largos tubos, como hifas no tabicadas. Un grupo de hifas entrelazadas y ramificadas constituye el micelio, y la parte que crece sobre su extremo y absorbe el alimento es el micelio vegetativo, mientras que el que se proyecta por arriba del mismo y contiene las esporas se denomina micelio aéreo o reproductor. En el micelio aéreo, se producen las esporas características que, al ser sembrados en un sustrato adecuado, producen un proceso tubular (tubo germinal) que se desarrolla en micelio y eventualmente en una colonia de hongos. (Reynosa *et al*, 2015)

La reproducción sexual supone la formación de estructuras de morfología complicada, lo que facilita la fecundación y la consiguiente fusión nuclear y da por resultado la producción de esporas especializados llamados cigotos (por ejemplo: oosporos, ascosporos y cigosporos). El hongo que presenta fase sexual se denomina hongo perfecto.

Los imperfectos son los que no muestran fase sexual; en ellos las esporas son producidos directamente por el micelio o a partir de él. El tipo de espora que producen y la forma en que se efectúa la esporulación es importante para la identificación de los diferentes hongos. (Reynosa, *et al*, 2015).Figura 6

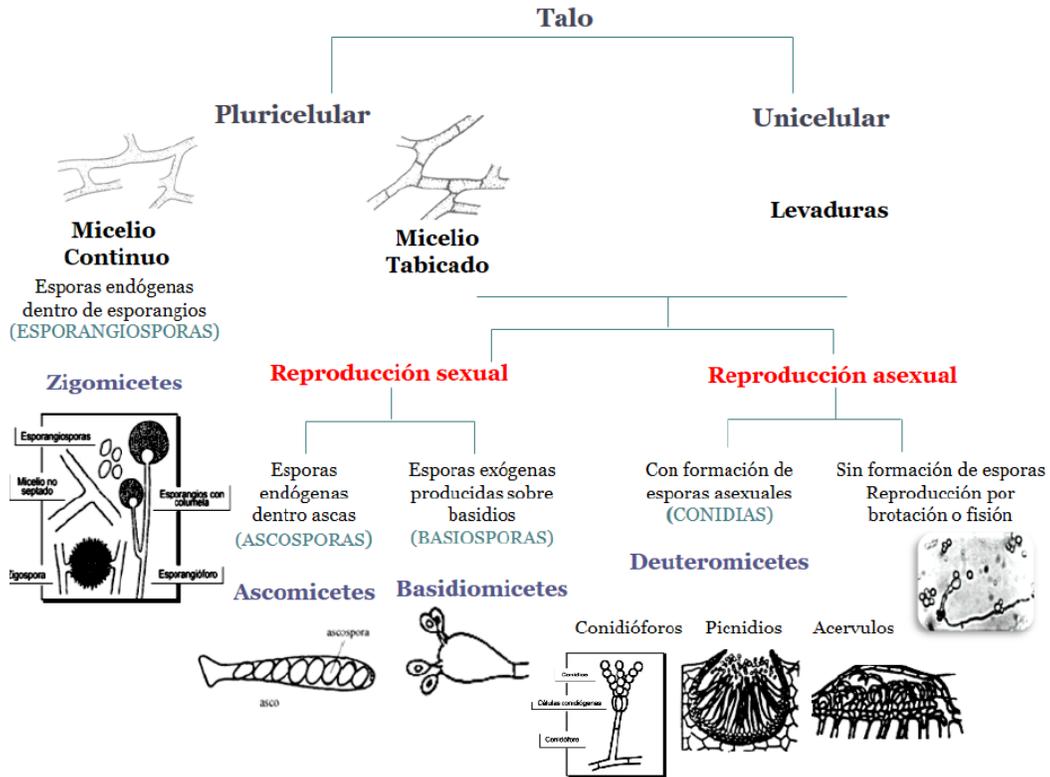


Figura 6. Esquema de hongos pluricelulares y unicelulares (Reynosa, *et al*, 2015)

Cultivo

El agar glucosado Sabouraud es un medio que puede ser utilizado para el aislamiento, identificación y conservación de hongos saprófitos y patógenos.

Es un medio nutritivo cuya alta concentración de glucosa y el pH ácido actúan inhibiendo el desarrollo bacteriano. El agregado de antibióticos aumenta la selectividad del medio y permite eliminar bacterias y hongos saprófitos indeseables a partir de muestras contaminadas. Los antibióticos que frecuentemente son utilizados son estreptomycin (100 ug/l), cloranfenicol (500 mg/l) y cicloheximida (0.5 mg/l) los cuales son agregados al medio de cultivo ya estéril y fundido a 45-50°C.

Algunos cultivos no esporulan ni producen pigmento en agar de Sabouraud. Para favorecer esto, han resultado útiles los medios especiales, como el agar con papa y dextrosa, el agar con papa y zanahoria, el agar con harina de maíz, agar arroz, o agar de Sabouraud con el agregado de tiamina e inositol. (Reynosa, *et al*, 2015).

Observación macroscópica de la colonia

El examen macroscópico se realiza a partir de una “macrocolonia” obtenida por sembrado de la especie fúngica en estudio en la parte central de una placa con medio de cultivo (Agar Glucosado Sabouraud). Para ello se emplea una aguja aplanada en uno de sus extremos en forma de espátula. Las placas son luego incubadas a temperatura ambiente (entre 20 y 30 °C) durante 3 a 15 días con observaciones diarias.

De esta colonia gigante se describirá:

a. Velocidad de crecimiento: es el tiempo que tarda la colonia en ocupar las 2/3 partes de la placa

- Rápido: entre 1 y 2 semanas.
- Moderado: entre 2 y 3 semanas.
- Lento: entre 3 y 4 semanas.

b. Topografía de la colonia:

- Forma: circular, irregular, filamentosa
- Elevación: plana y extendida, elevada y limitada, umbilicada
- Margen: entero, lobulado, desflecado, rizoide
- Superficie: plegada, con surcos radiados, cerebriforme

c. Pigmentación en anverso y reverso de la colonia o pigmento difusible en el medio.

d. Textura: granulosa, pulverulenta, vellosa, aterciopelada, algodonosa.

e. Tamaño: crecimiento limitado o crecimiento invasivo. (Reynosa, *et al*, 2015) Figura 7.

Observación microscópica

Esta técnica se utiliza para detectar el tipo de forma reproductiva (esporas), observando al microscopio: forma, tamaño, agrupamiento, color, etc. También se describirán las características de las hifas: presencia o ausencia de tabiques, grosor, hifas en raqueta, hifas en espiral.

Tal observación puede realizarse a partir de los cultivos en placa, mediante una lupa o con el objetivo 10X del microscopio, empezando desde el fondo hasta la parte superior de la colonia. Luego se hacen observaciones posteriores tomando, con un gancho, una pequeña muestra del micelio en desarrollo, la que se coloca en una gota de lactofenol (Fenol cristalizado, 20g; Ácido láctico, 20g; Glicerina, 40g; Azul algodón, 0,05g o Tinta Parker diluida al 40%, Agua destilada c.s.p. 20 ml.) u otro líquido de montaje (Iugol, azul de metileno) que colorea las estructuras y favorece el contraste. El preparado se observa en microscopio óptico con aumento de 10x y 40x. Una manipulación de este tipo rompe y desorganiza las estructuras del organismo, pues la disposición característica de la que depende la identificación se pierde y no es posible clasificarlo, por ello el método recomendado por examinar los hongos es la técnica de cultivo en portaobjetos o microcultivo, ya que permite manejar y observar la especie sin modificar su desarrollo, y el arreglo y acomodo de sus partes permanecen intactas. (Reynosa, *et al*, 2015)

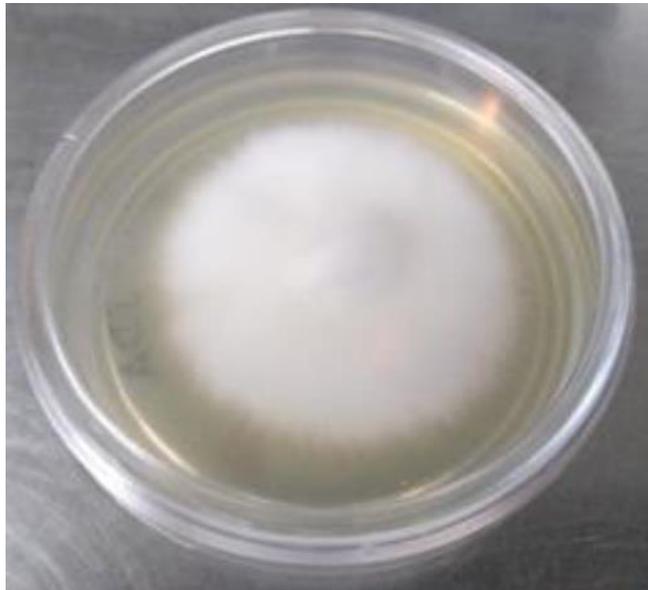


Figura 7. Colonia *Microsporium canis* tomada en LASAP FESC

2.4 Dermatofitosis

Es una micosis o infección superficial de la capa córnea de la piel, que puede afectar a distintas partes del cuerpo y recibe distintos nombres en función de la zona afectada:

- **Tiña de la cabeza:** afecta principalmente al cuero cabelludo, pelo y anexos (cejas o pestañas) de niños.
- **Tiña corporal:** afecta principalmente al tronco, abdomen, extremidades y cara.
- **Tiña crural** (tiña de la ingle, tiña inguino-crural o tiña inguinal): afecta a la región inguinal, aunque puede alcanzar los genitales, la región pubiana y la piel de las zonas perineal y perianal. Se da principalmente en varones adultos.
- **Tiña de la barba** (sicosis de la barba o sarna de los barberos).
- **Tiña de las manos:** afecta a las palmas de las manos, principalmente de varones adultos con trabajos manuales.
- **Tiña de pies** (pie de atleta).

Las manifestaciones clínicas son lesiones eritematosas-escamosas y pruriginosas; a veces, formación de abscesos, vesículas y pápulas. En general, la enfermedad no es grave y se cura con el tiempo.

Muchos tratamientos tienen el propósito de tratar estas enfermedades, pero muchos de ellos han resultado ineficientes o han causado efectos colaterales. Los nuevos tratamientos antimicóticos han incorporado componentes naturales como el propóleo. (Tovar, *et al*, 2014).

En México, las tiñas se consideran entre las 10 dermatofitosis más frecuentes, constituyen entre 70 y 80% de todas las micosis y tienen una frecuencia de 5% en la consulta dermatológica. Las topografías de donde se aísla más comúnmente a *M. canis* son tiña de la cabeza y del cuerpo, ambas predominan en los niños. En el Instituto Dermatológico de Jalisco se realizó un estudio epidemiológico de las dermatofitosis, durante 10 años (1984-1993), en el que se encontró que estas infecciones representan 4% de la consulta dermatológica; el agente causal más importante es *Trichophyton rubrum*, seguido de *M. canis*.

En los últimos años se incrementaron las tiñas de tipo zoofílico por tener animales dentro del hogar, a menudo éstos son portadores asintomáticos de esporas de dermatofitos y pueden ser importantes fuentes de una infección, portadores o ambos. Entre las especies más aisladas en México están *Microsporum canis*. Esta especie ha evolucionado gradualmente a través del tiempo por cambios en su nicho ecológico, porque en un principio su hábitat fue el suelo y después pasó a los animales domésticos y de ahí al hombre. (Mayorga, 2016)

2.4.1 Diagnóstico

Desde el punto de vista del diagnóstico, es muy importante realizar una toma correcta del material. Cuando la lesión afecta a la piel lampiña, hay que efectuar una limpieza y desinfección con alcohol de 70% y rascar con bisturí estéril la periferia de la lesión.

Si afecta a los espacios interdigitales, deben rasparse ambos lados y la base de cada espacio interdigital y debe tomarse muestra siempre del cuarto espacio interdigital, ya que puede encontrarse allí el dermatofito a pesar de no existir lesión ninguna.

Cuando la lesión afecta al pelo, hay que tomar con unas pinzas los pelos enfermos de pocos milímetros de longitud, a veces mezclados con escamas, y desechar los pelos largos sanos. Se puede examinar el cuero cabelludo en una habitación oscura con luz de Wood. La piel normal muestra un color azul y las zonas infectadas una fluorescencia verde brillante. Tan solo es positiva en *M. audouinii*, *M. canis*, *Microsporum ferrugineum*, *Microsporum distortum* y *T. schoenleinii*; por el contrario, es negativa en *T. tonsurans*, *T. violaceum* y otras especies de *Trichophyton*. En el caso de las onicomicosis por dermatofitos, se debe rascar la parte más profunda de la cara interna de la uña. Todas las muestras obtenidas se remitirán en una placa Petri o contenedor estéril al laboratorio, para su procesamiento.

La identificación se efectúa, en primer lugar, por examen microscópico directo, para lo cual colocaremos una gota de KOH al 10-20% en un portaobjetos y mezclaremos con una pequeña cantidad del material a examinar (piel, raspado de uñas o pelos). A continuación, se pasa suavemente el portaobjetos a través de una llama baja de un mechero Bunsen, para facilitar el aclaramiento, pero evitando que hierva. También puede utilizarse azul de lactofenol, no siendo necesario en este caso el calentamiento. Para ello, colocar la muestra en un portaobjetos y dejar reposar a temperatura ambiente (durante unos minutos,

dependiendo de la cantidad de queratina de la muestra) antes de proceder a su observación.

Cuando la lesión es producida por un dermatofito se observan hifas septadas y artrosporas. Existen distintos tipos morfológicos: microspórico, microide, megaspórico y fávico, dependiendo del tamaño de las esporas (caso de estar presentes), o por la disposición en el interior o en la superficie del cabello: ectótrix y endótrix

El medio universalmente utilizado para el aislamiento de los dermatofitos es el agar glucosado de Sabouraud, pH 5,6, al que se le pueden añadir antibióticos (cloranfenicol, gentamicina, tobramicina), o antifúngicos (cicloheximida), para inhibir el crecimiento de bacterias y hongos contaminantes, por lo general presentes en este tipo de muestras clínicas. Otro medio que se usa con mucha frecuencia es el DTM (Dermatophyte Test Medium), que vira a color rojo como consecuencia de la alcalinización producida en el medio por el crecimiento del hongo. También pueden usarse el agar Mycosel o el Mycobiotic. Para facilitar la esporulación se usa el medio de Borreli, y para pruebas bioquímicas se emplea el agar *Trychophyton*. La prueba de la ureasa se realiza con el medio de agar urea de Christensen. Otra prueba que puede usarse es la de perforación *in vitro* del pelo, para diferenciar *T. rubrum* de *T. mentagrophytes*.

Las muestras se siembran sumergiendo las escamas de piel, fragmento de uñas o pelos por debajo de la superficie con un gancho de alambre o asa de inoculación. Todos los medios de cultivo sembrados para dermatofitos se incuban a 22-25 °C, o a temperatura ambiente. Cuando se sospeche la implicación de *T. verrucosum*, se incubará otra placa a 30°C.

Los cultivos se mantendrán en incubación, al menos, durante 30 días antes de descartarlos como negativos, examinándolos cada 5 días. Generalmente, la esporulación se produce a los 7-10 días de incubación; aproximadamente a las dos semanas es el mejor momento para observar el aspecto característico de las colonias y su morfología microscópica. (Koneman, *et al*, 1984).

2.5 *Microsporium canis*

Microsporium spp. es un hongo filamentoso perteneciente al filo *Ascomycota*, macroscópicamente es de crecimiento rápido a 25°C-30°C. Las colonias son de aspecto lanoso, con bordes desflecados, de coloración amarillenta o parduzca, con el tiempo van adquiriendo tonalidades más pardas y un aspecto pulverulento en el centro.

Microscópicamente presentan abundantes y grandes macroconidios, con forma de huso, de pared gruesa, rugosa, con hoyuelos o prominencias que semejan tubérculos y multiseptados (de 5 a 15 septos transversales). Los microconidios son piriformes o con forma de maza, en cortos racimos o sésiles y brotan lateralmente de las hifas.

Son frecuentes las hifas en raqueta, las clamidosporas y las hifas pectinadas en los cultivos viejos.

Microsporium spp. y *Trichophyton spp.* Son hongos con reproducción asexual en su forma parasitaria y con reproducción sexual en su forma saprófita en la naturaleza, conocida como forma perfecta o teleomorfa (*Arthroderma spp.*).

Los hospedadores son cánidos (perros), félicos (gatos), caprinos, ovinos, bovinos, equinos, porcinos, camélidos, humanos, primates no humanos, etc.

Microsporium pertenece a un grupo de hongos denominados dermatofitos, normalmente asociados a las zonas del cuerpo con queratina como: piel, pelo, plumas y uñas. Se clasifican en tres grupos en función de su principal reservorio, bien sea animal (zoofílico), humano (antropofílico) o el suelo (geofílico).

Las esporas infecciosas sobreviven en distintas superficies, en la ropa, en el suelo, en el agua dulce y salada y, durante meses, en escamas de la piel a temperatura ambiente.

La transmisión se produce por el contacto directo o indirecto. Contacto cutáneo con las formas infectantes del hongo (artrosporas o conidios) presentes en la piel, el pelo o las lesiones de personas o animales enfermos o portadores, principalmente gatos y perros (zoonosis),(Figura 8), o bien presentes en la tierra, el polvo y las herramientas o las superficies contaminadas con escamas o pelos afectados (fómites).

Las corrientes de aire facilitan la dispersión de las esporas o formas infectantes.

La transmisión de los dermatofitos geófilicos es del suelo a los animales y al hombre; la de los zoófilicos es de los animales al hombre.

Es uno de los agentes causales más frecuentes de dermatomicosis en todo el mundo, especialmente en Europa, (incluido el Mediterráneo y Europa central), Asia, África y América Latina. Sin embargo, en América del Norte y el Reino Unido la tiña del cuerpo es causada principalmente por *Trichophyton tonsurans*.

El principal reservorio de *M. canis* son los gatos y perros, así como algunas otras especies de mamíferos, incluidos los conejos. Se han descrito infecciones de humano a humano en neonatos que se encuentran en cuidados intensivos, cuya causa, al parecer, fue una enfermera infectada.



Figura 8 Lesiones dermatológicas ocasionadas por *Microsporum canis* en caninos (Reynosa, et al ,2015)

2.6 Antimicóticos

Las drogas antimicóticas pueden clasificarse según su mecanismo de acción. Pueden agruparse, también, de acuerdo con su indicación, en antimicóticos, para tratar micosis sistémicas y/o superficiales. A pesar del gran aumento en la incidencia de micosis sistémicas, debido a la pandemia del SIDA y a la inmunosupresión dada por los trasplantes, no se han introducido nuevos fármacos para uso sistémico en los últimos años. (Vives *et al*, 2004)

2.6.1 Azoles: imidazoles y triazol

Existen varios antimicóticos derivados azoles, que pueden ser utilizados por vía tópica y algunos por vía sistémica (oral o i.v.). Los imidazoles y los triazoles se consideran juntos porque comparten el mismo espectro antimicótico y el mismo mecanismo de acción, aunque los triazoles sistémicos se metabolizan más lentamente y tienen menores efectos sobre la síntesis de esteroides endógenos que los imidazoles

a. Imidazoles:

*Ketoconazol (Orifungal) oral

*Econazol (Micolis) tópico

*Butoconazol

*Isoconazol (Mupaten) tópico

*Sulconazol

*Bifonazol (Mycospor) tópico

*Miconazol (Daktarin) tópico, i.v.

*Clotrimazol (Empecid) tópico

b. Triazoles:

*Terconazol

*Itraconazol (Sporanox) oral

*Fluconazol (Triflucan) oral, i.v.

Desde la aparición de estos compuestos (1978) la terapéutica de las dermatomicosis ha cambiado, debido a que estos agentes poseen amplio espectro antimicótico, su gran potencia redujo la duración del tratamiento de las micosis (por ejemplo, las micosis vaginales se trataban por 3 semanas, ahora, con los azoles 1-3 días; también se redujo el número de aplicaciones a 1 por día (antes 2-4 aplicaciones/día).

Química: Los imidazoles más importantes y los 1,2,4-triazoles poseen un sustituyente aromático heterocíclico con un átomo de N en posición 3. Los imidazoles poseen 2 átomos de N en el anillo azol y los triazoles poseen 3 átomos de N en el anillo azol.

Espectro antimicótico: Los azoles son de amplio espectro antimicótico, sobre todos los hongos patógenos para el hombre y animales. Incluyendo hongos que causan infecciones superficiales como las formas mucocutáneas de candidiasis, *Tinea pedis*, *capitis*, *cruris* y *versicolor* y muchos hongos que causan infecciones sistémicas como coccidioidomicosis, criptococosis, blastomicosis, histoplasmosis y paracoccidioidomicosis (Blastomicosis Sudamericana). Se ha demostrado que los nuevos triazoles (Itraconazol, Fluconazol) son clínica y microbiológicamente más activos que el ketoconazol contra hongos como *Aspergillus*, *Candida albicans*, *Blastomyces dermatitides*, *Coccidioides immitis*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, *Microsporum canis*, *Paracoccidioides immitis*, *Sporotrix schenckii* y especies de *Trichophyton*. No tienen actividad antibacteriana o antiparasitaria, excepto contra el protozoo *Leishmania major*.

Mecanismo de acción: Inhiben la enzima esterol 14-alfa-desmetilasa, una monooxidasa dependiente del citocromo P450. De este modo los imidazoles y triazoles deterioran la síntesis del ergosterol de la membrana del hongo y se acumulan 14 - metilesteroles. Estos metilesteroles pueden romper la unión estrecha de los fosfolípidos, afectando las funciones de las enzimas de membrana e inhibiendo el crecimiento fúngico. Algunas epoxidaciones también están involucradas en la biosíntesis del colesterol de mamíferos, lo cual trae efectos tóxicos en estos, sin embargo, está demostrado que los azoles tienen mucho mayor afinidad por las enzimas del hongo.

Resistencia: Las raras cepas mutantes obtenidas en pacientes se hallaron en tejidos superficiales y aparentemente no causan enfermedad invasora profunda.

Captación del azol: después de 15-20 min. hay un máximo de captación intracelular del

compuesto azol, permanece en el hongo por más de 120 hs. Esto llevaría a una prolongada inhibición de la biosíntesis del ergosterol y como consecuencia una marcada pérdida de la virulencia in vivo.

2.6.2 Ketoconazol

Es un imidazol activo por vía oral, a diferencia del clotrimazol y miconazol que son activos solo por vía tópica, este último también puede utilizarse por vía i.v. pero es sumamente tóxico.

Farmacocinética: Se absorbe en forma variable por vía oral. El ketoconazol requiere un medio ácido para absorberse, por ello los pacientes que reciben antihistamínicos bloqueadores de los receptores H₂ (cimetidina, ranitidina, famotidina) o antiácidos pueden tener dificultades en la absorción. La ingestión de alimentos no interfiere la absorción. La distribución es limitada y penetra poco a líquido cefalorraquídeo, se elimina por leche materna. La vida media aumenta con la dosis, si es de 200 mg es de 4hs. Y con una dosis de 800 mg puede llegar a 7-8 hs. El ketoconazol se metaboliza extensamente y los metabolitos inactivos se eliminan por las heces.

El ketoconazol llega en concentraciones adecuadas a los queratinocitos y en líquido vaginal la concentración es similar a la plasmática. La rifampicina disminuye la concentración de ketoconazol a un 50% por inducción enzimática hepática. El ketoconazol interacciona además con ciclosporina interfiriendo con el metabolismo de esta que puede llegar a niveles tóxicos y producir nefrotoxicidad. También puede potenciar el efecto de la warfarina.

Efectos colaterales: Los más frecuentes son náuseas, anorexia y vómitos y son dosis dependientes (10% de los pacientes), se los puede reducir administrando la dosis con alimentos, al acostarse o en dosis divididas. Un 4% de pacientes puede sufrir reacción alérgica. Como vimos, el ketoconazol inhibe la síntesis de esteroides del hongo y de células del paciente en menor grado, mediante la inhibición de enzimas dependientes del citocromo P450, cerca del 10% de las mujeres presentan irregularidades menstruales, en los hombres se ha observado ginecomastia, disminución de la libido y la potencia. Dosis de 400 mg/día pueden causar disminución de los niveles plasmáticos de testosterona, c-17 β -estradiol libres, también puede disminuir la hidrocortisona plasmática estimulada por ACTH. Se han evaluado dosis de 800-1200 mg/día para inhibir la liberación de hidrocortisona en pacientes con Cushing o la de testosterona en pacientes con carcinoma prostático. En pacientes en

condiciones de stress (traumatismos, grandes quemaduras, cirugía) es prudente suspender el ketoconazol para evitar la aparición de enfermedad de Addison. Un 5-10% de pacientes pueden sufrir aumento de aminotransferasa plasmática que ceden espontáneamente. Es poco frecuente la aparición de hepatitis sintomática, pero es potencialmente grave, los síntomas son semejantes a los de la hepatitis A, aunque también puede aparecer un cuadro colestásico o mixto. En casos de sospecha de afección hepática deben hacerse controles estrictos. El ketoconazol es teratogénico en ratas (produce sindactilia), por lo que está contraindicado durante el embarazo y la lactancia, debido a que se elimina por la leche materna.

Dosis: La dosis usual para adultos es de 400 mg/día, niños mayores de 2 años pueden recibir 3,3 a 6,6 mg/kg en una sola toma diaria.

Usos terapéuticos: El ketoconazol es el fármaco de elección para el tratamiento de la blastomicosis, histoplasmosis, coccidioidomicosis, pseudoallescheriasis y paracoccidioides no meníngeas (debido a su pobre penetración al LCR), también en pacientes que no están enfermos de gravedad y que son inmunológicamente competentes (debido a que esta droga es de respuesta lenta). Es el agente de elección en las candidiasis mucocutáneas crónicas. Es útil en las candidiasis oral y esofágica, aunque no da resultados en pacientes inmunodeprimidos. El ketoconazol es útil en la tiña resistente a griseofulvina y también en la tiña versicolor diseminada.

El ketoconazol es un agente eficaz, sin embargo, su indicación en esporotricosis linfocutánea, criptococosis pulmonar y cromomicosis no dio buenos resultados.

No está indicado en la mucormicosis ni en las micosis meníngeas. (Valsencia, 1993).

2.7 Antecedentes del uso de propóleo en caninos

2.7.1 Neoplasias

Se ha utilizado el EEP contra células de Tumor Venéreo Transmisible, la cual es una neoplasia contagiosa y de transmisión sexual principalmente en investigaciones científicas brasileñas en las cuales expusieron *in vitro* a células de TVT obtenidas a través de biopsia de perros con este padecimiento, se les adicionó propóleo a diferentes concentraciones y se evaluó el efecto a las 6, 24 y 48 horas. Después de 6 horas se observó una significativa actividad antiviral a bajas concentraciones, sin embargo, esto disminuía conforme aumentaba el tiempo (Bedascaburre, *et al* 2006).

2.7.2 Microorganismos

a) Bacterias

Se analizaron extractos etanólicos de propóleo a concentración de 20% y 40% siendo esta última la más efectiva contra *S. aureus*, (*causante* de piodermas) sin embargo, también se observó que no fue mejor la inhibición que este ejercía sobre la bacteria al comparar la respuesta de sensidiscos impregnados con penicilina.

b) Levaduras

La otitis externa es una inflamación del conducto auditivo que puede ser causada por parásitos, hongos, alergias o cuerpos extraños y es una de las principales razones por las que los perros se presentan a consulta. Se ha demostrado la eficacia de la aplicación tópica de extracto de propóleo como una nueva terapia para las otitis en perros. (Cruz, *et al*, 2014)

2.7.3 Inmunoestimulante

Se ha comprobado que el EEP en combinación con vacunas de Parvovirus canino y Coronavirus canino mejora la producción de anticuerpos después de la inmunización luego de la tercera dosis, a los 21 días se midió en suero IgG y se comprobó que la coadministración de EEP mejoró significativamente la especificidad sérica de IgG como respuesta a Parvovirus en animales inoculados con las más altas concentraciones del antígeno y no tuvo influencia en los niveles de anticuerpo contra coronavirus. (Núñez, 2018)

2.7.4 Oftalmopatías

Se ha comprobado su eficacia en perros y gatos que padecían de blefaritis, conjuntivitis de origen infeccioso, edemas corneales, obstrucción de conductos lagrimales, queratoconjuntivitis secas, úlceras corneales y glaucoma como se observa en la Tabla 1 (Tovar, 2016)

Efecto	Enfermedad	Experimental
Antimicótico	Otitis canina: <i>Malassezia pachidermatis</i> <i>Candida spp.</i>	Clínico
	Dermatofitos: <i>Microsporum canis</i> <i>Microsporum gypseum</i>	Clínico
Antineoplásico	TVT	<i>In vitro</i>
	Osteosarcoma	
	Enfermedad de Cushing	Clínico
Bactericida	<i>S.aureus</i> <i>Pseudomona spp</i> <i>Preoteus spp</i> <i>E.coli</i>	<i>In vitro</i>
Inmunoestimulante	Distemper canino Parvovirus canino	<i>In vitro e In vivo</i>
Oftálmico	Blefaritis Conjuntivitis Queratoconjuntivitis Glaucoma	Clínica
Paradontal (Ilewiks, 1979)	Gingivitis Parodontitis	Clínica
Metabólico	Enfermedad del hígado	Clínica
Antiparasitario	Giardiasis	<i>In vivo</i>
	Tripanosomiasis	<i>In vivo</i>

Tabla 1 Perspectivas del uso de propóleo *in vivo e in vitro* (Tovar, 2016)

2.7 Herramientas para el estudio estructural de *Microsporium canis*

La microscopía de fluorescencia se basa en el siguiente principio: un átomo en un estado excitado puede perder energía y regresar a su estado base de diferentes formas y al hacerlo emitir luz de longitudes de onda más grandes pero en menor intensidad que las absorbidas anteriormente y que lo estimulan. Cuando los átomos absorben la luz, los electrones de los mismos realizan una transición hacia niveles más altos de energía. La energía de los fotones absorbidos es inversamente proporcional a la longitud de onda de la luz e igual a la diferencia entre el nivel menor de energía (estado base) y el estado al que llegó el electrón cuando se excitó. La diferencia entre la energía del estado base y el más alto depende de la estructura del átomo y corresponde a su espectro de absorción .

Los fluorocromos son sustancias que tienen la propiedad de emitir un fotón de una longitud de onda determinada cuando son excitados por otro fotón de una longitud de onda característica.

El blanco de calcofluor (CF) es un fluorocromo ampliamente utilizado en hongos para teñir paredes celulares de levaduras e hifas; se utiliza normalmente a concentraciones típicamente mayores a 25 μM que interfieren con la síntesis de quitina y el crecimiento celular . El CF se une a las paredes celulares de hongos al intercalarse en cadenas nuevas de quitina, previniendo el ensamblaje de otras microfibras de quitina

También se utiliza yoduro de propidio (PI) también es un fluorocromo afín al ADN. El PI se adhiere al ADN por intercalación entre las bases con pequeña o nula preferencia por conjuntos de 4-5 pares de bases de DNA . También se adhiere al ARN, pero se requiere un tratamiento con nucleasas para distinguir entre ARN y ADN (Segura, 2008)

3. JUSTIFICACIÓN

Dada la escasa información que se tiene de los propóleos de abejas nativas, tanto en su uso como agente antimicótico, como en la terapéutica veterinaria, este trabajo justifica continuar con la investigación de los antimicóticos, ya que en la actualidad nos encontramos con una alta resistencia a los mismos, siendo de uso cotidiano en la práctica clínica.

4. HIPÓTESIS

Dado que el propóleo ha probado tener actividad antimicótica, al utilizarlo como tratamiento *in vitro* en las infecciones por *Microsporum canis* tendrá un efecto antimicótico igual o mayor que el ketoconazol.

5. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antimicótica *in vitro* de propóleo procedente de abeja sin aguijón *Scaptotrigona mexicana* contra *Microsporum canis*, y comparar su efectividad contra ketoconazol

5.1 Objetivos particulares

1. Obtención de propóleo de *Scaptotrigona mexicana*
2. Obtener el extracto etanólico del propóleo (EEP)
3. Determinar el perfil químico del extracto etanólico mediante lo que dicta la NOM-003-SAG/GAN-2017.
4. Evaluación de cromatografía de gases masa
5. Evaluación del efecto antimicótico del EEP mediante las siguientes pruebas:
 - a. Método de difusión en agar
 - b. Determinación de la concentración fungicida mínima mediante el método de 24 pozos en agar modificado
6. Evaluar el daño estructural que causa el EEP a *Microsporum canis* mediante:
 - a. Microscopía Óptica
 - b. Microscopia de fluorescencia (prueba de blanco de calcoflour y yoduro de propidio).

6. Diseño experimental (Figura 9)



Figura 9 Diseño experimental

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Propóleo

Se obtuvo un propóleo en greña de *Scaptotrigona mexicana* Procedente de Cuautitlán del Parral, Yecuatla, Veracruz de la Llave México, a 520 msnm y se encuentra en las coordenadas GPS Longitud (dec) 96 775556 Latitud (dec) 19 865000 (Figura 10) al cual, se le realizó el procedimiento para procesarlo a extracto etanólico como nos marca la NOM-003-SAG/GAN-2017 (Propóleos, producción y especificaciones para su procesamiento y posteriormente a este extracto se le realizaron las pruebas cualitativas y cuantitativas).



Figura 10. Georreferencia del propóleo

Preparación del Extracto Etanólico de Propóleos (EEP).

Se pesó una cantidad de 500 gramos del propóleo en bruto, previamente acondicionado, se añadió etanol al 70% en propóleo: disolvente 1:3 y se dejó macerar por un período de 72 horas, se extrajo con baño ultrasónico por 20 min a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se filtró y el filtrado se concentró con un rotovapor, se pasó el extracto a un envase ámbar, empleando la mínima cantidad de etanol al 70%, y se dejó a sequedad utilizando una bomba de vacío. Se conservó en refrigeración y protegida de la luz hasta el momento de realizar el análisis.

7.1.1 Especificaciones físicas

1. **Determinación del color:** Se colocó la muestra sobre una superficie blanca y se comparó con una escala de colores; realizándose en un ambiente con buena iluminación. Se utilizó un microscopio estereoscópico para visualizar definitivamente los colores presentes utilizando el Catálogo Internacional de Colores.
2. **Determinación del aroma:** Se retiró una porción de la muestra a fin de que el envase no interfiera en la percepción olfativa.
3. **Determinación del sabor:** Se colocó una porción de la muestra en la parte media de la lengua y se analizó mediante la comparación de sus atributos de sabor con los que mejor se distinguen.
4. **Consistencia a temperatura ambiente:** Se retiró una porción de la muestra y se colocó en un vidrio de reloj, hasta que alcance la temperatura ambiente. Se determinó la consistencia tocándola con los dedos y comparándolo con el atributo que mejor la describa. Suave y maleable a temperaturas entre 20 y 40 °C y rígido a temperaturas inferiores a 20 °C. (Tabla 2)

Parámetros	Características
Color	Rojo, amarillo-rojizo, amarillo-oscuro, verde castaño, pardo o negro, variando conforme a su origen botánico.
Aroma	Resinoso (olor a madera) o balsámico (olor a cera), 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.

Tabla 2 Especificaciones físicas del propóleo

7.1.2 Pruebas cualitativas de EEP

Flavonoides

Se utiliza Hidróxido de sodio al 20%: Un color amarillo intenso es característico de presencia de flavonoides

Fenoles

La mayor parte de los fenoles dan coloraciones fuertes (azul, verde, violetas y marrones), para la detección se utiliza cloruro férrico hexahidratado al 10%

7.1.3 Pruebas cuantitativas de EEP

Fenoles

Se mide por espectrofotometría de absorción UV-VIS con base a una reacción colorimétrica de óxido- reducción, para ello el agente oxidante que se utiliza es el reactivo de Folin-Ciocalteu (mezcla de ácido fosfotungstico/fosomolibdico hexavalente): el cual se requiere mínimo un 5%.

Flavonoides

El principio básico del método colorimétrico de cloruro de aluminio es que ésta forma complejos estables de ácidos con el grupo cetona en C-4 o bien el grupo hidroxilo en C-3 o C5 de flavonas y flavonoles. Además, también forma complejos lábiles ácidos con los grupos hidroxilos en el anillo A o B de los flavonoides: mínimo se requiere un 0.5% de equivalente de quercetina.

7.1.4 Cromatografía de gases masa

El análisis cromatográfico de los extractos etanólicos fue realizado en un cromatógrafo de gases (6850) acoplado a un espectrómetro de masas (Modelo 7890, JEOL MC-GC-Mate II, Japón). La columna capilar fue una HP-5MS (30 m × 0.32 mm) y grosor de película de 0.25µm. Como gas acarreador se utilizó Helio. El tipo de inyección fue en modo Split y el volumen de inyección de 1 µL. Las condiciones de separación utilizadas fueron al inicio una temperatura de 70 °C por 2 min con dos incrementos de rampa. El primero de 20 °C por minuto hasta alcanzar los 230 °C; el segundo fue de 8 °C por minuto hasta llegar a los 290°C manteniéndose por 5 min. El tiempo total de análisis fue 21.25 min. El rango de masa detectado fue de 35 m/z a 750 m/z, la muestra fue ionizada por impacto electrónico a 70 eV y la temperatura alcanzada por la fuente de ionización fue de 230 °C. La identificación de los compuestos fue llevada a cabo por comparación con la biblioteca de la base de datos del equipo.

7.2 Evaluación de la actividad antifúngica

Microorganismo utilizado

- Se obtuvo la cepa de *Microsporum canis* del laboratorio de Micología de la Facultad de Medicina UNAM, por donación de la Biol. Elva Esther Bazán encargada del cepario.

7.2.1 Prueba de sensibilidad cualitativa

Esta prueba de sensibilidad fue adaptada de Estrada *et al.*, (2012)

a). Activación de la Cepa. - Para su crecimiento se sembró en Agar SDA, esperando 7 días de incubación a temperatura ambiente en total oscuridad, para poder identificar y corroborar que fuera *M.canis* (Figura 12)

b). Técnica de microcultivo

1. Se corta un pequeño bloque de agar SDA previamente vertido en una caja de Petri hasta una profundidad de 4 mm. Esto puede hacerse usando una hoja de bisturí estéril o una espátula con un borde cortante o un tubo de prueba recto estéril.

2. Sobre una segunda caja de Petri estéril se coloca un papel de filtro y dos bases de madera cortados de un tamaño tal como para encajar en la caja y sobre los mismos se coloca un portaobjetos estéril.
3. Con ayuda de un asa o una porta estéril se coloca el bloque de agar en la superficie del portaobjeto.
4. Con el asa se remueven porciones pequeñas de la colonia de hongos que se desea estudiar y se inoculan los cuatro cuadrantes del bloque de agar.
5. Luego de la inoculación, se coloca un cubreobjetos estéril sobre la superficie del agar.
6. Los discos de papel de filtro en el fondo de la caja se mantienen húmedos con agua estéril durante el período de incubación.
7. La colonia crecerá por debajo de la superficie del cubreobjetos. Se examina el montaje periódicamente a simple vista para determinar si la colonia ha madurado. Cuando es evidente un crecimiento suficiente, se retira cuidadosamente el cubreobjeto con pinzas estériles y se coloca en un portaobjetos con azul de algodón.

c). Tinción de azul de algodón.

Esta técnica se utiliza para detectar el tipo de forma reproductiva (esporas), observando al microscopio: forma, tamaño, agrupamiento, color, etc. También para describir las características de las hifas: presencia o ausencia de tabiques, grosor, hifas en raqueta, hifas en espiral.

Tal observación se realizó a partir del cultivo en agar SDA, tomando, con un asa de inoculación, una pequeña muestra del micelio en desarrollo, la que se coloca en una gota de azul de algodón (Figura 11), la cual colorea las estructuras y favorece el contraste. El preparado se observa en microscopio óptico con aumento de 10x y 40x. Una manipulación de este tipo rompe y desorganiza las estructuras del organismo, pues la disposición característica de la que depende la identificación se pierde y no es posible clasificarlo, por ello el método recomendado para examinar los hongos es la técnica de cultivo en portaobjetos o microcultivo, ya que permite manejar y observar la especie sin modificar su desarrollo, y el arreglo y acomodo de sus partes permanecen intactas.

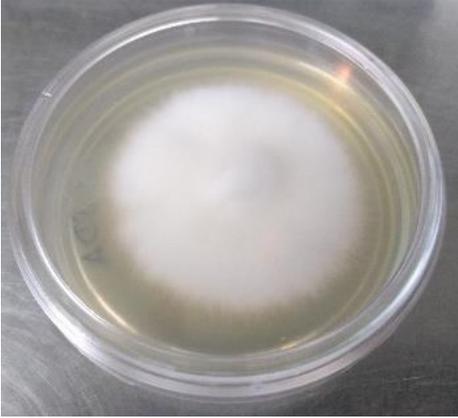


Figura 12 . Cepa de *M.canis* en agar SDA con 10 días de crecimiento



Figura 11 vista microscópica de macroconidias con tinción de azul de algodón

7.2.2 Prueba de difusión en agar

a) Preparación de los discos

-Discos con EEP: Se emplearon discos estériles de papel Whatman N. 5 de 5mm de diámetro impregnados con 10 microlitros de EEP a las siguientes concentraciones 16, 32, 64 y 128 mg/ml y se dejaron secar a temperatura ambiente

Dichas concentraciones se prepararon mezclando EEP con alcohol al 96%

- Discos con Ketoconazol se utilizó el mismo procedimiento que en los discos de EEP pero aquí se utilizó una concentración de 50mg/ml de preparado de ketoconazol

b) Realización de la prueba

A partir de la cepa reactiva que obtuvimos se tomó con una pipeta Pasteur de vidrio el inóculo para poder obtener el mismo tamaño de cepa en todas las cajas de agar SDA, posteriormente se colocaron los discos previamente impregnados con propóleo y ketoconazol en las diferentes concentraciones y se colocaron a los lados del inóculo. Todas las cajas se incubaron a temperatura ambiente por 10 días. La prueba se realizó por triplicado.

7.2.3 Método de dilución de 24 pozos.

En esta prueba se utilizaron las siguientes concentraciones de propóleo 128, 256, 512 mg/ml, se preparó una solución stock de propóleo de 1500mg/3ml de etanol al 96%. Se preparó agar SDA en tubos de vidrio el cual almacenaba 2 ml de solución de cada concentración, realizando la prueba por triplicado.

Se emplearon placas de 24 pozos adicionando a cada pozo 1 ml del medio ya conteniendo 1ml de la solución de propóleo

Para la parte de control negativo se comparó con ketoconazol a una concentración de 50mg/ml haciéndolo de la misma manera y por triplicado

Los tres últimos pozos se utilizaron como el control positivo solamente contenían el agar y la cepa.

Se inoculó en el centro de cada pozo un fragmento del cultivo de *M. canis* de 1mm de tamaño. Se incubó la placa a total oscuridad en temperatura ambiente y monitoreamos crecimiento a los 5, 15 y 30 días.

7.2.4 Determinación del daño celular

Para la evaluación del daño celular de *M. canis* causado por el propóleo, se realizó la técnica descrita por Londoño 2010. Se utilizaron las preparaciones del hongo tratadas con el EEP a las concentraciones de 128, 256 y 512 mg/ml.

Se tomó una alícuota de la suspensión del hongo para cada preparación con un asa bacteriológica y se montó en un portaobjetos agregándole además una gota de azul de algodón y un cubreobjetos para la observación al microscopio. A continuación se incubaron a 28°C las suspensiones del hongo para su posterior evaluación a las 24 horas.

A las 24 horas de la prueba se realizó la tinción con blanco de calcoflúor (M2R Sigma, preparado al 0.1%) y yoduro de propidio 2.4 mmol (Sigma, Aldrich), a las 3 concentraciones de EEP. Esta tinción se realizó con el mismo procedimiento que la tinción de azul de algodón. El objetivo de esta tinción fue determinar si el propóleo causó alguna alteración en la estructura de la pared celular del hongo. Esta tinción genera fluorescencia, por lo tanto, se utilizó el microscopio de fluorescencia del Laboratorio del

Servicio de Análisis de Propóleos (LASAP) de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria para su observación.

Se tomaron fotografías del hongo tratado a las diferentes concentraciones empleando un microscopio óptico (Carl Zeiss, Axioscop 40) teniendo acoplada una Cámara (Evolution VF Cooled Color Media Cybernetics) y procesadas por medio del Software Q Capture Pro 6.0.

Con las imágenes obtenidas se evaluaron las diferencias en la morfología de las hifas de *M. canis* en las diferentes concentraciones al propóleo, así como las alteraciones encontradas por microscopia de fluorescencia

Análisis estadístico.

Se realizó el análisis estadístico del diámetro de cinco hifas de *M. canis* de la preparación control, Ketoconazol a 50mg/ml y del hongo tratado a las 3 concentraciones del propóleo, para esto se utilizó el programa Graph Pad Prism versión 9, calculando con el programa el análisis de varianza (ANOVA) (López, 2012)

8. RESULTADOS

8.1 Propóleo

El propóleo utilizado en el presente trabajo presentó un color amarillo a oscuro (Tabla3), con un aroma resinoso (olor a madera), con sabor fuerte picoso y con una consistencia a temperatura ambiente maleable.

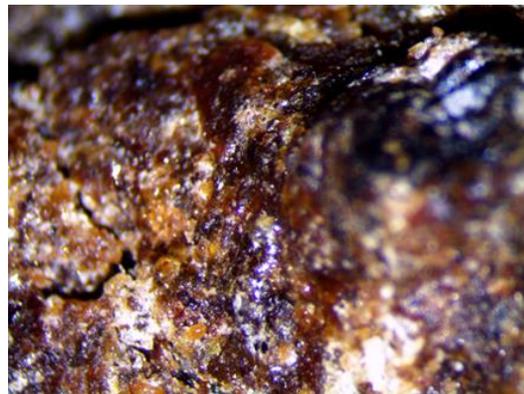
8.1.1 Especificaciones físicas

Parámetros	Características
Color	Amarillo- Oscuro (Figura 10)
Aroma	Resinoso (olor a madera)
Sabor	Fuerte picoso
Consistencia	A temperatura ambiente maleable.

Tabla 3 Características físicas del propóleo empleado



Figura 13 Vista macroscópica del propóleo



**Figura 11.1 Vista macroscópica del propóleo
(Microscopio estereoscópico 10X)**

8.1.2 Pruebas cualitativas

En la prueba cualitativa de propóleo se puede observar una coloración café en la prueba de fenoles, lo cual indica su presencia y en la prueba de flavonoides se observa una coloración amarillenta la cual es la esperada como se muestra en la Figura 14 y 15.

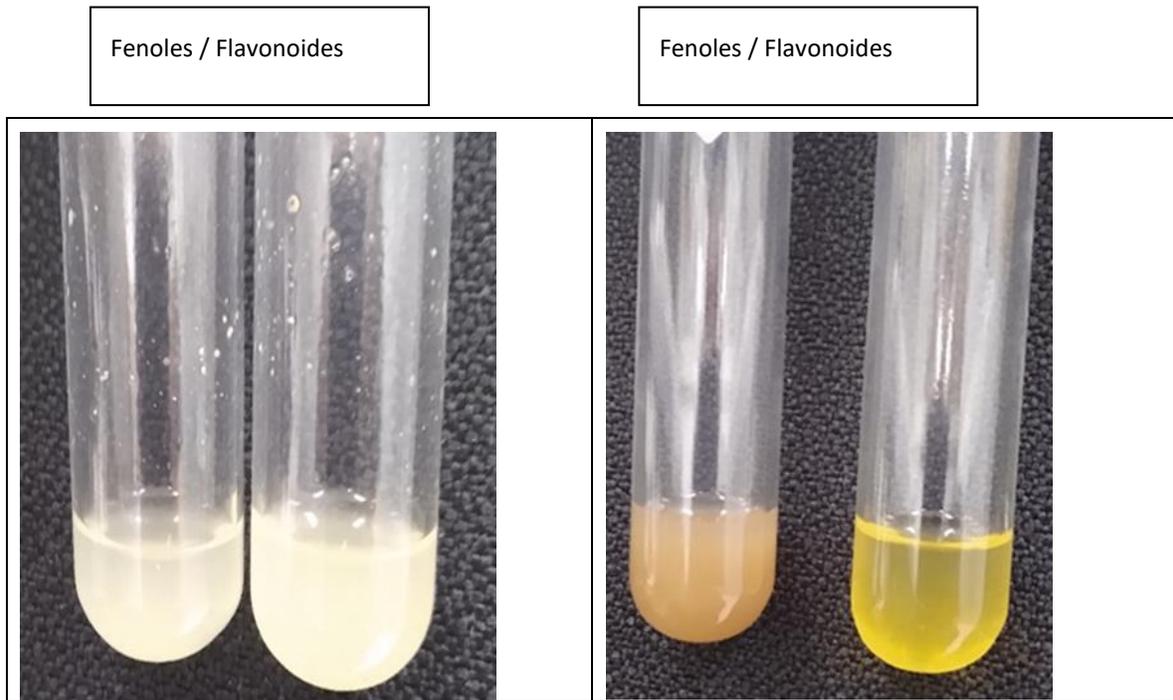


Figura 14. Prueba cualitativa del propóleo mezcla sin el reactivo Figura 15. Reacción a los componentes

8.1.3 Pruebas cuantitativas

a. Fenoles

La muestra utilizada en el presente trabajo contenía un 4.7% de ácido gálico (Tabla 4), sin embargo la norma indica que se requiere un mínimo un 5% de la presencia de ácido gálico para considerarse un propóleo de buena calidad (NOM-003-SAG/GAN-2017 (Propóleos, producción y especificaciones para su procesamiento), y posteriormente a este extracto se le realizaron las pruebas cualitativas y cuantitativas, lo cual nos indica que la muestra contiene fenoles, pero no en gran cantidad para poder tener una alta actividad. La figura 14 muestra la curva de calibración con la cual se pudo obtener la concentración de ácido gálico en la muestra, la cual consideró un rango de concentración de 0.1 a 0.2 mg/ml.

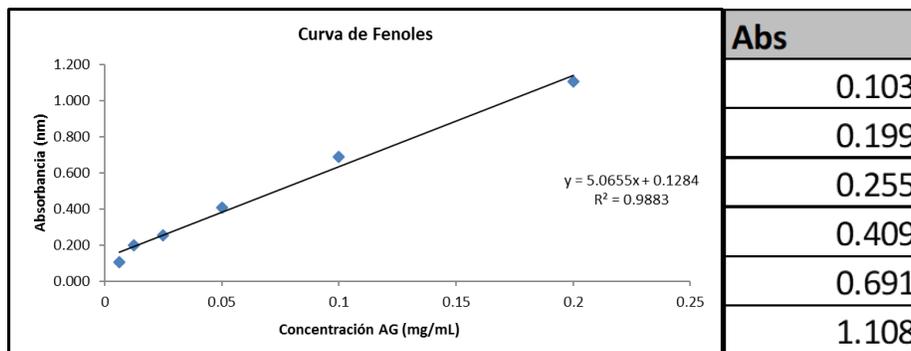


Figura 16. Curva de calibración para obtener la concentración de ácido gálico en la muestra de propóleo. Se muestra también los valores de absorbancia (Abs en nm).

Muestra	Abs (nm)	Analito fen (mg/g)
B1.1	0.179	0.01
B1.2	0.162	0.0066
B1.3	0.188	0.0118
Promedio	0.095	
SD	0.0026	
CV	0.28	

Tabla 4 . Resultados de la muestra de extracto de propóleo que muestra la absorbancia y la concentración de fenoles del analito.

b. Flavonoides

Mínimo se requiere un 0.5% de equivalente de quercetina y la muestra obtuvo un 0.9% lo cual nos reporta que la actividad antifúngica es posiblemente gracias a los flavonoides ya que lo tenemos sobre lo indicado en la NOM.

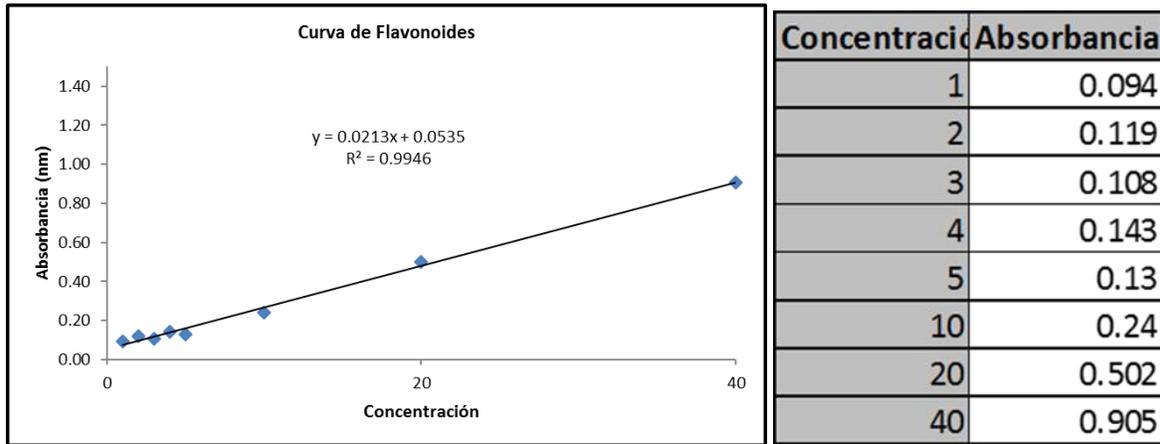


Figura 17. Curva de flavonoides y totales

8.1.4 Cromatografía de gases masa

Los resultados del análisis de cada muestra de propóleo mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) se muestran en las Tabla 5 así como en la Figura 16 donde se indican los principales compuestos con una identificación certera ($\geq 90\%$) con relación a la base de datos del equipo. Los compuestos con actividad antimicrobiana encontrados fueron los sesquiterpenos, una cetona y un compuesto heterocíclico con grupos aldehído.

Pico	Tiempo de Retención (TR)	Compuesto propuesto por la base de datos	Clasificación química	Actividad biológica	Referencia
2	30.6	1,4-Metanocicloocta[d]piridazina, 1,4,4a,5,6,9,10,10a-octahidro-11,11-dimetil-, (1.alfa.,4.alfa.,4a.alfa.,10a.alfa.)- 1,4-Metanocicloocta[d]pyridazina, 1,4,4a,5,6,9,10,10a-octahidro-11,11-dimetil-, (1a,4a,4aa,10aa)-	Piridazina (compuesto heterocíclico)	Antioxidante	Urbizu et al., 2017
5	31.58	Fanersol Isómero a Farnesol isómero a	Sesquiterpeno	Antimicrobiano	Delmondes et al., 2020
6	32.48	Etanona, 1-(1,3a,4,5,6,7-hexahidro-4-hidroxi-3,8-dimetil-5-azulenil)-	Cetona Sesquiterpénica	Antimicrobiano	Fatnasi et al., 2011
8	33.68	2H-1-Benzoxaciclohexadecina,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14-dodecahidro-18,18a-dihidroxi-2-metil	Macrociclo	Actividad no reportada	Chen et al.,1977
9	33.7	Furan-2,5-dicarbaldehído 2,5-Furandicarboxaldehído	Compuesto heterocíclico con grupos aldehído	Antioxidante Antimicrobiana	Muriira et al.,2015 Otieno, 2016

Tabla 5. Constituyentes del propóleo de *Scaptotrigona mexicana* caracterizado por CG-EM

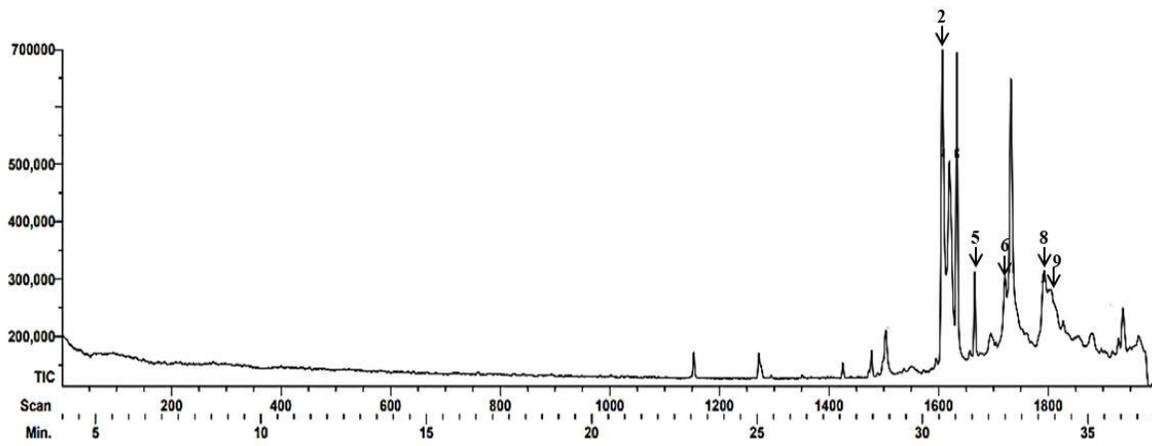


Figura 18 Cromatograma de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) correspondiente al propóleo de *Scaptotrigona mexicana* y los principales compuestos detectados.

8.2 Prueba de sensibilidad cualitativas

8.2.1 Prueba de difusión en agar

Se encontró una ligera inhibición de *Microsporum canis* a una concentración de 128 mg/ml de extracto de propóleo (Figura 19-E), asimismo se nota como la cepa deja de crecer redonda (D) del lado izquierdo y se hace un crecimiento recto, en contraste con la imagen del ketoconazol en la cual se observa que la cepa crece recta (E).

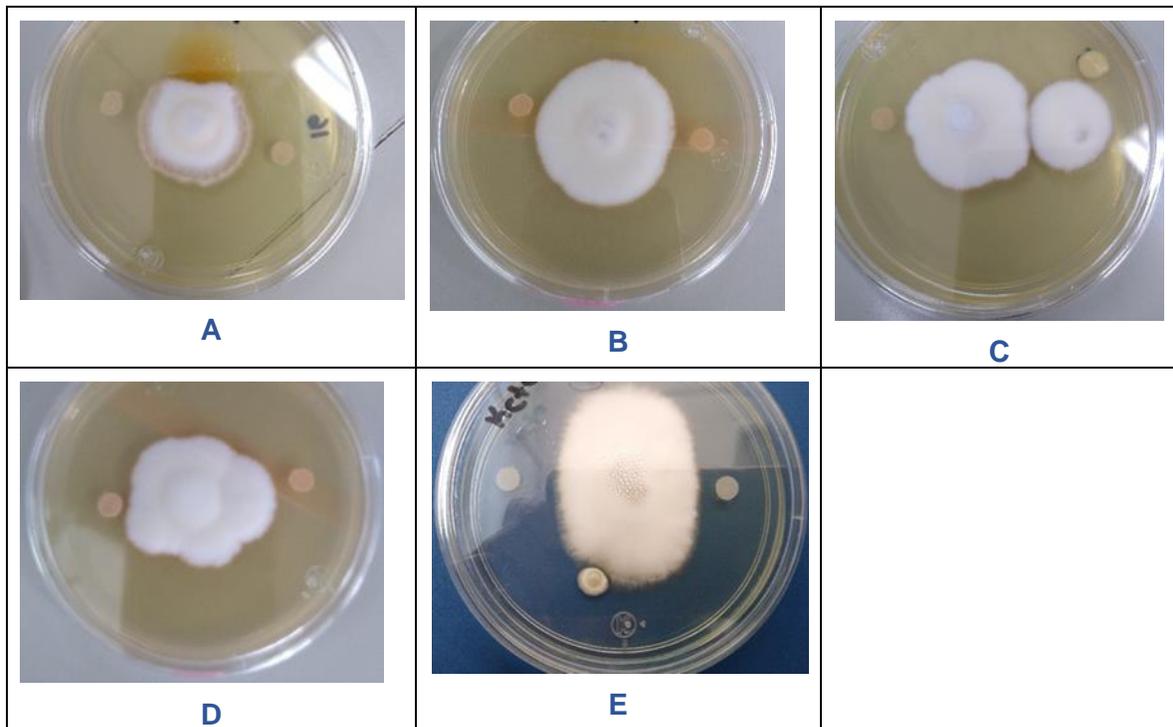


Figura 19. Prueba de difusión radial con extracto etanólico de propóleo, concentraciones de 16 mg (A), 32 mg (B), 64 mg (C) y 128 mg (D) , así como con ketoconazol 50 mg (E).

8.3 Prueba de sensibilidad cuantitativa

8.3.1 Método de 24 pozos en agar modificado

Esta prueba se realizó por triplicado monitoreando los resultados desde el día de sembrado (0), y días 5, 15 y 30, a las diferentes concentraciones utilizadas del propóleo, y se observó inhibición en los tres carriles de propóleo (Figura 20-B) y que al día 30 ya se observa crecimiento en los pozos que contienen el ketoconazol (Figura 20-D)

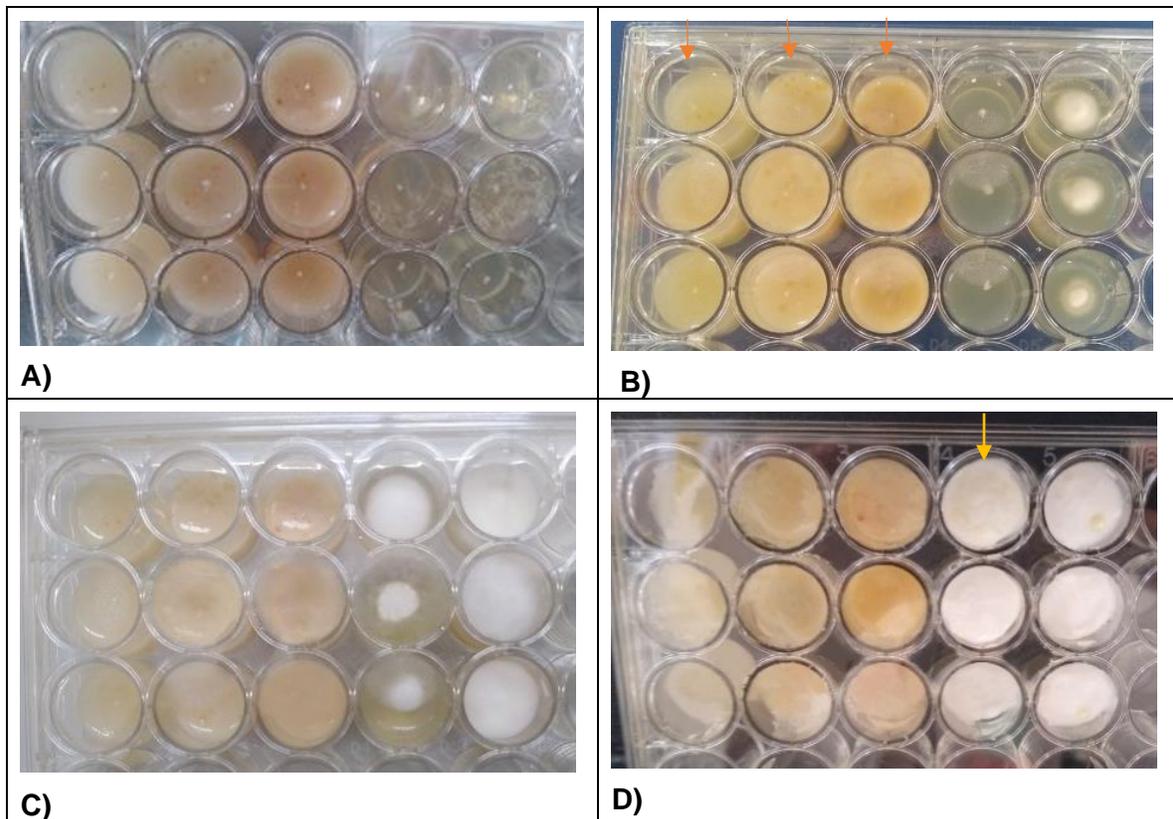


Figura 20. Prueba de 24 pozos en agar SDA se puso la muestra por triplicado se muestra en las filas de izquierda a derecha: concentración 128 mg, 256 mg, 512 mg, ketoconazol y grupo control. Se observa el crecimiento de la cepa de *M.canis* desde el día a) 0, b)5, c)15 y d) hasta el 30 .

8.3.2 Daño celular

: Se observaron las imágenes obtenidas analizando 5 hifas por campo, a las distintas concentraciones del EEP (128, 256 y 512 mg/ml) a las 24 horas de incubación. (Figura 21)

En las preparaciones sin tratamiento (0 mg/ml de EEP) a las 24 horas, se observaron hifas sin ninguna alteración morfológica, lo cual presenta *M.canis* cuando este no tiene alguna alteración. Contrariamente, encontramos diversas alteraciones en la morfología de las hifas tratadas con EEP desde de las 24 horas, las cuales se iban acentuando con el paso del tiempo. Las alteraciones que se encontraron en las hifas principalmente fueron:

- EEP 128 mg/ml hifa ensanchada (D)
- EEP 256 mg/ml hifas más pequeñas (C)
- EEP 512 mg/ml hifas ensanchadas (E)
- Ketoconazol 50mg/ml hifas más pequeñas y quebradas (B)
- Control (A)

Se realizó tinción de azul de algodón para hacer las observaciones.

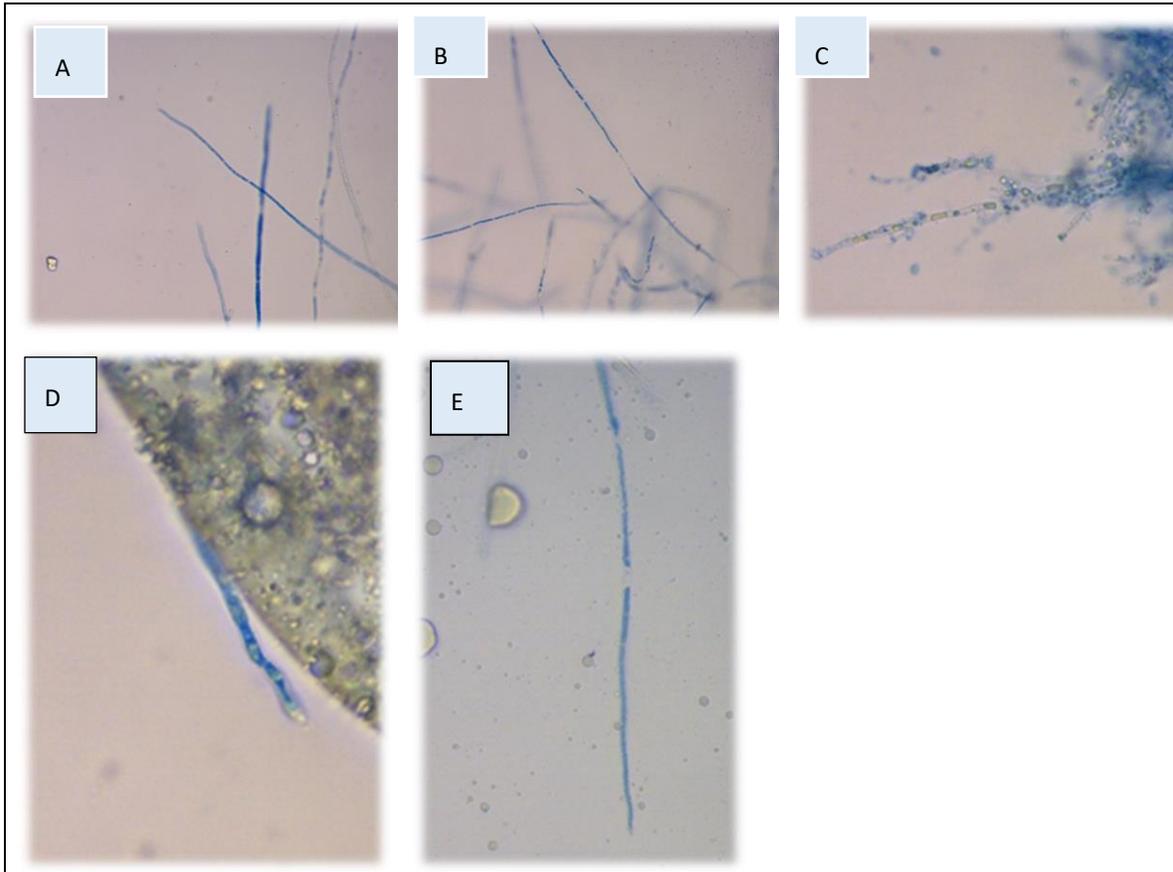


Figura 21 Tinción azul de algodón, cambio de hifas 24 horas después de aplicar las concentraciones de EEP
A) Control, (hifas sin cambio) B) Ketoconazol (Hifas adelgazadas) 50 mg/ml, C) 256 mg/ml, D) 128 mg/ml,
E) 512 mg/ml (hifas ensanchadas) (vista 100 X)

Determinación del ancho de las hifas

Se realizó la medición en micras del ancho de las hifas y se hizo prueba de ANOVA empleando un nivel de significancia de $P < 0.05$, observando que las hifas tratadas con el EEP a 512 mg/ml tuvieron un ensanchamiento significativo comparado con las hifas control y las hifas tratadas con ketoconazol. (Tabla 5)

Hifas	128mg/ml	256mg/ml	512mg/ml	Ketoconazol	Control
1	3.405878	2.845719	2.995595	3.857853	2.995595
2	2.51936	2.646465	2.845719	3.857853	2.339167
3	2.845719	2.339167	14.61558	3.562913	1.479419
4	3.308082	2.51936	12.13665	4.024455	3.771793
5	4.2105	2.646465	9.321514	3.373594	1.686797
Promedio	3.2579078	2.5994352	8.3830116	3.7353336	2.4545542

Tabla 5 . Medición de ancho de hifas (micras) y promedios, (Se observa la gran diferencia comparando el grupo control el cual tiene un ancho promedio de 2.4 micras a comparación del grupo de EEP a 512 mg/ml con 8.3 micras) y el grupo control el cual no tenía ningún tratamiento .

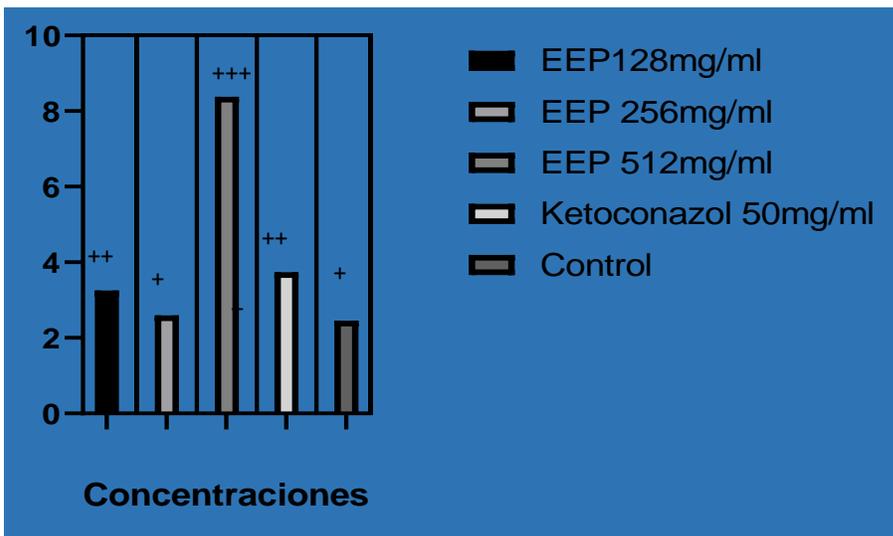


Figura 22. Promedio de ancho de hifas, prueba de ANOVA empleando un nivel de significancia de $P < 0.05$, observando que las hifas tratadas con el EEP a 512 mg/ml (+++) tuvieron un ensanchamiento significativo comparado con las hifas control y las hifas tratadas con ketoconazol

Determinación del daño celular

La tinción de blanco de calcoflúor presenta afinidad por la quitina, principal componente de la pared celular de los organismos fúngicos. Se observaron las hifas teñidas de color azul , y para determinar su viabilidad se utilizó la tinción de yoduro de propidio, que es considerado un eficiente indicador de viabilidad celular, por su afinidad al DNA, se observaron hifas de color rojo, lo cual indica que el colorante atravesó la pared celular debido al daño provocado por el EEP.

En la tinción de blanco de calcoflúor y yoduro de propidio observamos que hay daño celular en las hifas al aplicar el EEP , al igual que en ketoconazol se observa destrucción y adelgazamiento de hifas como podemos observar en la Figura 23.

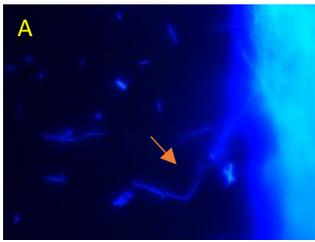
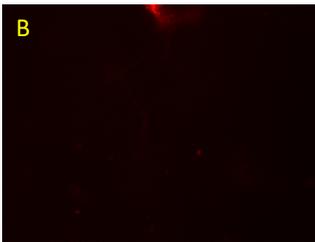
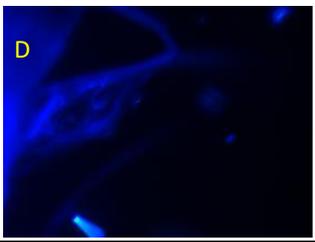
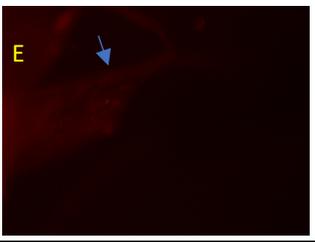
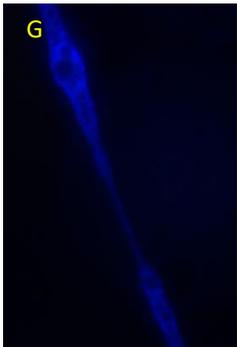
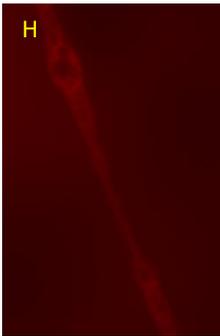
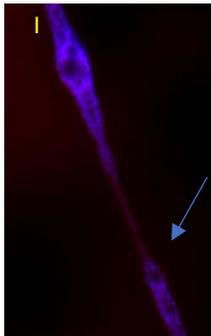
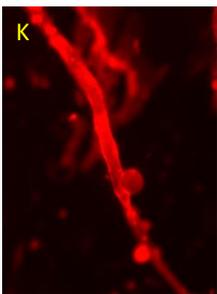
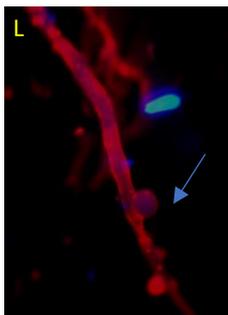
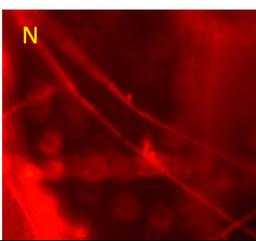
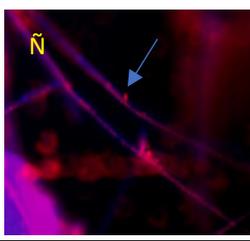
Concentración / Tinción	Blanco de calcofluór	Yoduro de Propidio	BC/Y
Control			
Ketoconazol 50 mg/ml			
EEP 128 mg/ml			
EEP 252 mg/ml			
EEP 512 mg/ml			

Figura 23. Imágenes tomadas con microscopio de fluorescencia. En el grupo control (A) podemos observar una hifa sin daño (flecha roja), en el grupo de Ketoconazol (E) podemos observar al enfocar con el yoduro de propidio como se marca de rojo el interior de la hifa lo cual nos demuestra que el ketoconazol logro entrar a la hifa debido a la ruptura de la membrana, en los 3 grupos en donde se utilizó el EEP a diferentes concentraciones en el 128 mg/ml (I) observamos vacuolas y que el yoduro logro entrar a la hifa , en el de 252 mg/ml (L) observamos lo mismo que en la concentración anterior y las vacuolas más grandes y definidas y en la concentración 512 mg/ml (Ñ) observamos adelgazamiento y ruptura de las hifas (Flecha azul)

9. DISCUSIÓN

El extracto de propóleo de la abeja *Scaptotrigona mexicana*, en su evaluación *in vitro*, tuvo actividad antimicótica, comprobando nuestra hipótesis principal, lo que justifica su uso para el tratamiento de las dermatofitosis contra *Microsporum canis*.

Se observó actividad antimicótica a una concentración de 128 mg/ml, lo cual es una dosis alta, esto hace imprescindible realizar más investigación para medir la actividad antimicótica en concentraciones menores de propóleo de esta especie de abeja.

Esto significa que, al igual que otros propóleos ya explorados el de esta especie tiene, también, cualidades tan importantes como las que nos presenta Cruz (2020) respecto a la *Apis mellifera* frente a *Candida albicans*.

En la prueba de difusión agar SDA se utilizó el EEP en las siguientes concentraciones 16 mg, 32 mg, 64 mg, y 128 mg/ml, así como ketoconazol y un grupo control. Se observó una ligera inhibición en la concentración a 128 mg/ml, ya que la cepa dejó de crecer redonda del lado izquierdo, comparándolo con la imagen del ketoconazol, en la cual se observó que la cepa creció recta, coincidiendo con lo que reportó Estrada (2012), donde se detectó que la caja de control con antifúngicos tenía grandes halos con inhibición, al igual, se observó inhibición en los discos con propóleo en concentraciones de 4, 8, 12 y 16 mg/ml, determinando que ese método no es adecuado para el propóleo de *S. mexicana* pues no hubo buena adhesión del propóleo a los discos.

Se observó que el ketoconazol tiene una función fungistática ya que en la prueba realizada para determinar la concentración mínima inhibitoria por el método de 24 pozos en agar modificado, se obtuvo que, al día 15 post inoculación, la cepa de *Microsporum canis* comenzó a crecer, en comparación, con el propóleo de *Scaptotrigona mexicana*, después de 30 días de incubación no hubo crecimiento alguno observable en ninguna de las concentraciones utilizadas (128, 256 y 512 mg/ml), resultado que es diferente a lo que encontró Estrada (2012) con el EEP de *Apis mellifera* ya que su CMI fue de 0.25 mg/ml lo cual indica que se tienen que bajar las concentraciones que se utilizaron para esta prueba y así poder encontrar la CMI del propóleo de *Scaptotrigona mexicana*. Lo cual tal vez sea un hallazgo importante de este trabajo donde se demuestra que el propóleo no origina resistencia.

En la prueba cualitativa de propóleo se puede observar una coloración café en la prueba de fenoles, lo cual indica su presencia y en la prueba de flavonoides se observa una coloración amarillenta la cual es la esperada como menciona en la NOM-003-SAG/GAN-2017, la cual menciona que un color amarillo intenso es característico de los flavonoides, y que la mayor parte de los fenoles dan disoluciones coloreadas (azul, verde, violeta, entre otros). Si el color es amarillo débil (mismo que el reactivo), la reacción se considera negativa. Algunos fenoles no dan coloración, como la hidroquinona, ya que se oxidan con el reactivo a quinona. Los ácidos, a excepción de los fenólicos, no dan la reacción, aunque algunos dan disoluciones o precipitados de color amarillento.

Las propiedades organolépticas que se encontraron en la muestra de propóleo fueron muy parecidas a las propiedades que describe Viloría *et al*, (2012): Color amarillo- oscuro, aroma resinoso con olor a madera, sabor fuerte picoso, consistencia maleable. También coinciden con las propiedades físicas que se mencionan en la NOM-003-SAG/GAN-2017.

En las pruebas cuantitativas del propóleo se encontró un 4.7 % de ácido gálico para la prueba de fenoles, sin embargo, la norma indica que se requiere un mínimo de 5%, lo que significa que no hay suficiente cantidad de fenoles, lo que podría implicar que no tenga propiedades antimicóticas. Por otra parte, se obtuvo que en la prueba de flavonoides mínimo se requiere un 0.5% de equivalente de quercetina y nuestra muestra obtuvo un 0.9% lo cual nos reporta que la actividad antifúngica que estamos obteniendo es gracias a los flavonoides ya que el porcentaje fue más alto.

Muchos de los metabolitos identificados en el propóleo de abejas nativas se encuentran en la literatura con diversas actividades biológicas, incluidas las antimicrobianas, antiinflamatorias, citotóxica, antioxidante, hepatoprotectora y antiulcerosas, entre otros (Mohd, 2019). El extracto de propóleo estudiado presenta composiciones químicas considerablemente diferentes entre sí. Si bien, en otros estudios la cantidad y diversidad de compuestos encontrados son abundantes (Bakchiche, *et al*, 2020) en comparación con los resultados de este estudio para *Scaptotrigona mexicana* o en otras especies como *Melipona beecheii* (Ramon, *et al*, 2019) y otras en el mundo (Bankova, *et al*, 2007) es importante considerar que la diversidad floral, la estación del año de la recolecta, la especie de abeja, son factores determinantes en la composición de cada propóleo. Se detectaron principalmente compuestos pertenecientes a los sesquiterpenos, a los que se les han atribuido actividades antimicrobianas (Peng, *et al*, 2020).

Para el caso de *Scaptotrigona mexicana* es pertinente mencionar que el furan-2,5-dicarbaldéido, es un heterocíclico con grupos aldehído, al realizar la búsqueda bibliográfica del mismo, no se encontró el mismo compuesto, pero se reporta un compuesto similar, el 2-acetil-5-metilfurano con actividad contra *Escherichia coli*, *Candida albicans* y *Staphylococcus aureus* (Otieno,2016).

Se realizó el tratamiento con el EEP sobre *Microsporium canis*, con la finalidad de comprobar el daño celular causado sobre las hifas por el EEP mediante la técnica de microscopía de fluorescencia con las tinciones de blanco de calcoflúor y yoduro de propidio. Para esto, se emplearon las concentraciones de EEP de 128 mg/ml, 254 mg/ml y 512 mg/ml, Ketoconazol 50 mg/ml y paralelamente un control sin EEP, lo cual permitió observar su efecto fungicida mediante su comparación. El blanco de calcoflúor presenta afinidad por la quitina, principal componente de la pared celular de los organismos fúngicos(Ramos, 2006). Al utilizar el filtro UV, se pueden observar las hifas teñidas de color azul, aunque para determinar su viabilidad se utilizó la tinción de yoduro de propidio, considerado un eficiente indicador de viabilidad celular, por su afinidad al DNA (Rivera, 2017). Al colocar el filtro verde se observaron hifas de color rojo, lo cual indica que el colorante atravesó la pared celular debido al daño provocado por el EEP. Se ha observado que el propóleo tiene un efecto de desorganización de la pared celular, membrana citoplasmática y citoplasma. Posteriormente, se realizó la sobreposición de las imágenes del mismo campo, para obtener una sola imagen y diferenciar hifas dañadas. Al igual que en el trabajo de Catalán (2019) con *Candida albicans* se observó daño en la pared celular y penetración de la tinción de yoduro de propidio, el cual marcó toda la hifa lo cual no se esperaba ya que el yoduro de propidio solo marca el núcleo de las células y al contraponer las imágenes nos damos cuenta que al romperse la membrana de la hifa también marco el ADN ribosomal que se encontraba dentro de ella.

Se realizó la medición en micras del ancho de las hifas y se hizo prueba de ANOVA empleando un nivel de significancia de $P < 0.05$, observando que las hifas tratadas con el EEP a 512 mg/ml tuvieron un ensanchamiento significativo comparado con las hifas control y las hifas tratadas con ketoconazol. A comparación de lo que encontró Estrada en el 2012 ya que ellos al evaluar el propóleo de *Apis mellifera* no hubo una diferencia estadísticamente significativa entre el diámetro de los macroconidios

10. CONCLUSIONES

1. El propóleo que se utilizó mostró tener sesquiterpenos y furan-2,5-dicarbaldéido, a lo que se relaciona con la actividad antimicótica encontrada.
2. Se encontró que la prueba de difusión en agar no es la idónea para este tipo de propóleo ya que no se obtuvo buena absorción en los discos, por lo tanto, en el presente trabajo se encontró una inhibición en la dosis más alta utilizada para esta prueba la cual fue de 128 mg/ml a comparación de la inhibición en el crecimiento con el ketoconazol.
3. Se observó que la determinación de la concentración mínima inhibitoria por medio del método 24 pozos en agar fue la prueba idónea para encontrar la CMI con el propóleo de abeja nativa ya que aquí vimos que la inhibición comienza desde 128 mg/ml.
4. La prueba que hasta el momento se ha encontrado sería la mejor elección para determinar la CMI y el daño celular del propóleo son las tinciones con blanco de calcofluor y yoduro de propidio con microscopia de fluorescencia.
5. En la determinación del daño observamos claramente la perforación que hay sobre la membrana al utilizar el extracto etanólico de propóleo sobre la cepa de *Microsporum canis*, provocando el ensanchamiento y vacuolas a lo largo de la hifa.
6. El propóleo de *Scaptotrigona mexicana* tiene efecto antimicótico sobre *Microsporum canis*.
7. Los hallazgos fundamentan el desarrollo de una formulación de uso tópico con propóleo de abejas nativas como una alternativa para el tratamiento de las dermatofitosis, cuyos beneficios son: ser un producto natural con actividad antimicótica de baja toxicidad a comparación de los antimicóticos comunes como el ketoconazol.

12. REFERENCIAS

- Ayala R. (1999). Revisión de las Abejas sin Aguijón de México (Hymenóptera: Apidae: Meliponini). Folia Entomológica Mexicana.
- Arnold.N, Zepeda. R, Vázquez. M, Aldasoro. M. M. (2018). Las abejas sin aguijón y su cultivo en Oaxaca, México, ECOSUR, Chiapas.
- Bakchiche B, Temizer IK, Aytaç GA, Çelemlı G, Yegin CB, Ghareeb MA. (2020). Chemical Composition and Biological Activities of Honeybee Products From Algeria. J. Appl. Biotechnol. Rep; 7: 93-103.
- Bankova V, Popova M. (2007). Propolis of Stingless Bees: a Promising Source of Biologically Active Compounds. Pharmacogn Rev; 1: 88-92.
- Bedascaburre, Maldonado. L, Fierrow, Álvarez. A. (2006) Propóleos, Primera Edición, Edit Magna Argentina, 28-66
- Bristow, I. (2005). Fungal infections of nails. New Perspectives Bristow. The International Journal of Lower Extremities Wounds (on line) 4:72-73.
- Catalan. M.E.(2019). Evaluación de la actividad antifúngica del propóleo del Estado de Morelos contra diversas especies del género *Candida*. FESC. UNAM
- Chen C, Change H, Kirk K. (1983-1987) Betulachrysoquinone hemiketal: a p-benzoquinone hemiketal macrocyclic compound produced by *Phanerochaete chrysospor*. Phytochemistry; 16: 1983-1985.
- Cruz. H.P.B (2020). El propóleo de Chihuahua inhibe el crecimiento de especies de *Candida*. Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Edo. De Mex. UNAM
- Cruz. L.M.E, Guillen, G.M Mejía. D.E, (2013) Tesis: Actividad antimicótica del extracto etanolico de propóleo sobre el crecimiento *in vitro* en *Candida albicans*. Universidad Nacional de Trujillo, Chile.
- Cruz. S.T.A, Estrada, G.P.A, López. Z.C.I, Austran, M.M, Perez, V.V, Londoño, O.A, (2014) Use of propolis for topical treatment of Dermatophytosis in dog, FESC, UNAM, MEX,
- Delmondes GA, Santiago LIC, Días DQ, Cunha GLD, Araújo IM, Barbosa R, Coutinho HDM, Felipe CFB, Barbosa FJM, Lima NTR, De Menezes IRA, Kerntopf MR. (2020)

Pharmacological Applications of Farnesol (C₁₅H₂₆O): A patent review. *Expert Opin Ther Pat.* 30: 227-234.

Estrada. G. P.A (2012). Evaluación *in vitro* del efecto del propóleo sobre *Microsporium canis*. Tesis UNAM para MVZ. UNAM, MEX.

Fatnassi S, Zarrouk H, Chatti S. (2011) Chemical composition and antimicrobial activity of volatile fraction of the peel of *Maclura pomifera* fruit growing in Tunisia. *J. Soc. Chim. Tunis.* 13:1-6.

González A. J.A. (2012) La importancia de la meliponicultura en México, con énfasis en la Península de Yucatán. *Bioagrobiocencias*; 5: 34-41.

Guzmán, F. (2018) La abeja prehispánica mejor que la europea. *Gaceta UNAM*.

Koneman EW, Roberts GD.(1984) Clinical and laboratory diagnosis of mycotic disease. En: Henry JB (ed). *Clinical diagnosis and management by laboratory methods*, 17^a ed. W.B. Saunders Co., Philadelphia.

Illewikz. L (1979). The effect of ethanol propolis extracts on the dental pulp in dogs. *Czas stomatal* 32, 32 1- 9.

López Z. C. I (2012) Evaluación *in vitro* del efecto del propóleo sobre *Microsporium gypseum*. UNAM, FESC, MEX.

Mayorga. J. (2016) Características clínicas y epidemiológicas de pacientes con infección por *Microsporium canis* . *Dermatol Rev Mex*;60:18-23.

Mohd BAA, Zin M, Annisava ARN, Nafi NNE, Mohd KS. (2019). Phytochemical screening and antioxidant properties of stingless bee *Geniotrigona thoracica* propolis. *Mal. J. Fund. Appl. Sci*; 15: 330–335.

Morales. M. E. (2015) “Perfil de HPLC, RMN y Actividad biológica de Extractos Etanólicos de Geopropóleos de Abejas Meliponas de la Región Centro de Veracruz. Tesis para obtener el grado de QFB. Universidad Veracruzana Facultad de química farmacéutica biológica.

Muriira KG, Nyagah MNE, Machocho AK, Nyawira WL, Mungiria JNM.(2015). Chemical Composition and *in vitro* Antioxidant Activities of *Ocimum americanum*. *Adv. Anal. Chem*; 5: 42-49

NOM-003-SAg/GAN-2017, Propóleos, producción y especificaciones para su procesamiento.

Núñez. D. (2018) Evaluación de la actividad anti-inflamatoria de propóleos chilenos sobre cortes histológicos de orejas de ratón. *Morphol.* Vol 36. No 1 Temuco.

Oliveira, A.C., C.S. Shinobu, R. Longhini, S.L. Franco, y T.I.E. Svidzinki. (2006). Antifungal activity of propolis extract against yeasts isolated from onychomycosis lesions. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz (Brasil)* 101:493-497.

Otieno, A.J. (2016). Antimicrobial activity and phytochemical profiles of *Warburgia ugandensis* sprague (canellaceae) extracts from different populations across the Kenyan Rift Valley A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Award of the Degree of Master of Science (Biotechnology) in the School of Pure and Applied Sciences of Kenyatta University.

Peng DQ, Yu ZX, Wang CH, Gong B, Liu YY, Wei JH. (2020) Chemical Constituents and Anti-Inflammatory Effect of Incense Smoke from Agarwood Determined by GC-MS. *Int. J. Anal. Chem*; 4575030: 1-19.

Peña. C.R (2008). Estandarización en propóleos: antecedentes químicos y biológicos. Facultad Agronomía e Ingeniería Forestal, Casilla 306-22, Santiago, Chile.

Ramon SJ, Peraz LE, Rodríguez BR, Yam PA, Madera ST, Ortiz VE. (2019) Partial characterization of ethanolic extract of *Melipona beecheii* propolis and in vitro evaluation of its antifungal activity. *Rev. Bras. Farmacogn*; 29:319–324.

Ramos, L. (2006). Empleo de blanco de calcoflúor para el estudio de las especies de *Malassezia* por microscopía directa. *Revista Argentina de Microbiología* 38(4), 213-222.

Reynoso, M. M., Magnoli, C.E, Barrios G .G, (2015). Manual de microbiología general. Edit UniRío.

Rivera Y, C. R., Terrazas, L. I., Jimenez, E. M., Campos, J. E., Flores O. C. M., Hernandez, L. B., ... Canales. M. M. M. (2017). Anti-Candida Activity of *Bursera morelensis* Essential Oil and Two Compounds, α -Pinene and γ -Terpinene-An In Vitro Study. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 22(12).

Roberts, D.T., W.D. Taylor, y J. Boyle.(2003). Guidelines for treatment of onychomycosis. British Journal of Dermatology 148:402-410

Robles, Z. R, Hernández, M. J, Garibay E.A, Valencia. R.D.E, Velázquez C. C.A. (2012). Botanical Origin and Biological Activity of Propolis. Pages 570-598 in Rai M, Cordell GA, Martínez JL, Marinoff M, Rastrelli L, eds. Medicinal Plants. Biodiversity and Drugs. St. Helier, Jersey, British Channel Islands: CRC Press.

Segura . M. L (2008). Técnicas de microscopía de fluorescencia y análisis de imágenes aplicadas al estudio de hongos micorrízicos. Facultad de Ciencias . UNAM, Mex.

Shanahan. M.Guzman D.M.A .(2017). Manual de Meliponicultura básica. Ecosur Chiapas México

Tovar, B.N, García.C.L, Cruz.S.T.A.(2014). Propolis in dogs: Clinical experiences and perspectives (A brief review). México, FESC.

Tovar. B. N. (2016). Evaluación antimicótica in vitro del propóleo mexicano sobre *Malassezia pachidermatis*. Tesis maestría UNAM MEX.

Valsecia. M (1993). Agentes antimicóticos sistémicos: https://www.med.unne.edu.ar/sitio/multimedia/imagenes/ckfinder/files/files/cap34_antimico_t.pdf

Viloria. B. J.D, Gil G. J.H, Durango. R.D, García. P. C.M, (2012). Caracterización fisicoquímica del propóleo de la región del bajo cauca antioqueño (Antioquia, Colombia). Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial Vol. 10 No. 1 (77 – 86).

Vives, E. A, M. V. Ventriglia, D. Medvedovsky, M. V. Gacitúa y R. Rothlin (2004). Drogas antimicóticas. Farmacología II. <https://farmacomedia.files.wordpress.com/2010/05/drogas-antimicoticas.pdf>

Urbizu G. A. L, Castillo R. O, Martínez A. G. C, Torres C. J. A. (2017) Natural variability of essential oil and antioxidants in the medicinal plant *Turnera diffusa*. Asian Pac. J. Trop. Biomed. 10: 121-125.