



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN

“EVALUACIÓN *IN VITRO* DEL EFECTO DE PROPÓLEOS
CON DIVERSOS ORÍGENES SOBRE EL DESARROLLO DE
LOS GÉNEROS *ASPERGILLUS* Y *FUSARIUM*”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:
ANEL IRAIS GARCIA LAGUNA

ASESOR: DRA. CAROLINA MORENO RAMOS
COASESORES: DRA. AMPARO LONDOÑO OROZCO
DR. TONATIUH ALEJANDRO CRUZ SÁNCHEZ



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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

DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: **VOTO APROBATORIO**



ATN: L.A. ARACELI HERRERA HERNÁNDEZ
Jefa del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos a comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Evaluación in vitro del efecto de propóleos con diversos orígenes sobre el desarrollo de los géneros Aspergillus y Fusarium

Que presenta la pasante: Anel Irais García Laguna

Con número de cuenta: 30524904 para obtener el Título de: Química Farmacéutica Bióloga

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

ATENTAMENTE

“POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 19 de agosto de 2013.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Enrique Salas Téllez	
VOCAL	Dra. Carolina Moreno Ramos	
SECRETARIO	QFB. Dulce María Ruvalcaba Sil	
1er. SUPLENTE	M. en C. Erik González Ballesteros	
2do. SUPLENTE	QFB. Leticia Cubillo Carrillo	

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

Esta investigación fue realizada gracias al apoyo económico brindado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM 223811-3
Perspectivas del uso del propóleo en la salud animal.

AGRADECIMIENTOS

A DIOS, gracias por permitirme llegar hasta aquí.

A MIS ASESORES, DRA. AMPARO LONDOÑO, DRA. CAROLINA MORENO Y DR. TONATIUH CRUZ, por brindarme la oportunidad de realizar este proyecto con ustedes, por sus conocimientos compartidos, enseñanzas, apoyo, tiempo y confianza.

A LA M. EN C. ELISA GUTIÉRREZ, por tus consejos y apoyo.

A LA MAMI DENISSE, por su compañía y apoyo.

A LOS MIEMBROS DEL JURADO. DR. TÉLLEZ, DRA. MORENO, QFB. RUVALCABA, M. EN C. GONZÁLEZ Y QFB. CUBILLO, por enriquecer este trabajo con sus comentarios.

A TODOS LOS PROFESORES que fueron parte de mi formación académica, gracias por su tiempo y conocimientos compartidos.

A MI MADRE CAROLINA LAGUNA, por tu amor y apoyo incondicional, por siempre alentarme a conseguir mis sueños, por siempre estar a mi lado, TE AMO MAMI.

A DORIAN GARCÍA, gracias hermana por tu apoyo, tus consejos, por ser luz y un pilar en mi vida TE AMO.

A DALIA GARCÍA, hermanita gracias por estar a mi lado y tomar siempre lo mejor de mí, me alientas a ser una mejor persona TE AMO.

A ERIKA LIMÓN, gracias amiga por tu amor incondicional, por siempre apoyarme, escucharme, engrandecer mis logros y estar siempre conmigo.

A SARAI GÓMEZ, por nunca dejarme caer, por confiar en mí, por escucharme, por tus consejos y por nunca irte.

A MÓNICA MARTÍNEZ, gracias por tus consejos y colaboración en este trabajo, sabes que eres mi colega y sobretodo mi amiga.

A MOISES MONZON GUALITO, por nunca cortarme las alas, por tu apoyo, consejos y hacerme reír en momentos difíciles y de estrés.

A MIS AMIGOS, SARAI, MONI, MARIANA, ALEJANDRO, MOY, GABRIEL, MARTIN, MEMO Y DAVID, por ser parte de esta etapa en mi vida.

DEDICADO A:

Una Gran mujer, que sin sus sacrificios y esfuerzos yo no estaría culminando esta etapa, este logro también es tuyo Carolina Laguna. Mi amor, admiración y respeto Mamá.

Mi padre que siempre ha estado a mi lado, y sé que en donde quiera que se encuentre está orgulloso de lo que hoy he logrado, por siempre te amo.

A mis hermosas hermanas pilares esenciales en mi vida.

A mi Chote y a la familia muégano los quiero.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
ÍNDICE DE GRÁFICAS.....	ix
ÍNDICE DE TABLAS.....	x
RESUMEN.....	xi
I. INTRODUCCIÓN.....	1
Generalidades de los hongos.....	1
Hongos como contaminantes.....	1
Micotoxinas.....	10
Propóleo.....	14
II. JUSTIFICACIÓN.....	22
III. OBJETIVOS.....	23
Objetivo general.....	23
Objetivos particulares.....	23
IV. HIPÓTESIS.....	24
V. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	25
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
Microorganismos.....	26
Propóleos.....	26
Medios de cultivo.....	26
1. Métodos para la identificación.....	27
2. Prueba de inhibición del crecimiento radial.....	28
3. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI).....	29
4. Análisis estadístico.....	30
5. Determinación de Aflatoxinas.....	31
6. Determinación de Fumonisinias.....	31
VII. RESULTADOS.....	33
Identificación de los hongos.....	33
Prueba de inhibición del crecimiento radial.....	35
Prueba de dilución en placa de 24 pozos.....	39
Extracción de Micotoxinas.....	44
VIII. DISCUSIÓN.....	47

IX.	CONCLUSIONES	51
X.	PERSPECTIVAS	52
XI.	REFERENCIAS	53
XII.	ANEXOS.....	57
	1. Agar papa dextrosa	57
	2. Siembra de Microcultivos.....	57
	3. Azul de lactofenol (Azul de algodón).....	58
	4. Antifúngicos.....	59

LISTA DE ABREVIATURAS

AF	<i>Aspergillus flavus</i>
AN	<i>Aspergillus niger</i> .
AO	<i>Aspergillus ochraceus</i> .
ATA	Aleucia Tóxica por Alimentación
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria.
EEP	Extracto Etanólico de Propóleo.
EGM	Glucomananos esterificados.
FESC	Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.
FM	<i>Fusarium moniliforme</i>
HACCP	Sistema de Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico.
IARC	International Agency For Research on Cancer.
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía.
IRAM	Instituto Argentino de Normalización y Certificación.
INTA	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.
MOS	Oligosacárido Manano Modificado.
NOA	Noroeste Argentino.
SAGARPA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.
UIM	Unidad de Investigación Multidisciplinaria.
g	gramos.
mg	miligramos.
mL	mililitros.
µl	microlitros
mm	milímetros.
µm	micrómetros.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Estructura de <i>Aspergillus flavus</i>	5
Figura 2.	<i>Aspergillus flavus</i> Tinción azul de algodón 40x.....	5
Figura 3.	Estructura de la cabeza conidial de <i>Aspergillus niger</i>	6
Figura 4.	<i>Aspergillus niger</i> a 40x.....	6
Figura 5.	Observación microscópica de <i>Aspergillus ochraceus</i>	7
Figura 6.	Estructura de <i>Fusarium moniliforme</i>	10
Figura 7.	<i>Fusarium moniliforme</i> Tinción azul de algodón 40x.....	10
Figura 8.	Crecimiento fúngico y localización de la síntesis de micotoxinas.....	11
Figura 9.	Producción de polen y propóleos en México.....	17
Figura 10.	Distribución de las concentraciones del extracto etanólico de propóleo en la placa de 24 pozos.....	29
Figura 11.	Morfología microscópica de <i>Aspergillus flavus</i> con la tinción azul de algodón.....	33
Figura 12.	Morfología microscópica de <i>Aspergillus niger</i> con la tinción azul de algodón.....	34
Figura 13.	Morfología microscópica de <i>Aspergillus ochraceus</i> con la tinción azul de algodón.....	34
Figura 14.	Morfología microscópica de <i>Fusarium moniliforme</i> con la tinción azul de algodón	35
Figura 15.	Control negativo de <i>Fusarium moniliforme</i>	36
Figura 16.	Inhibición del crecimiento radial de <i>Fusarium moniliforme</i> utilizando discos de Antimicóticos comerciales.....	36
Figura 17.	Inhibición del crecimiento radial de <i>Fusarium moniliforme</i> utilizando discos impregnados con EEP oriundo de la FESC UNAM.....	37
Figura 18.	Placa de 24 pozos para la determinación de la concentración mínima inhibitoria del EEP procedente de FESC UNAM, para <i>Fusarium moniliforme</i>	39
Figura 19.	Inhibición del crecimiento de <i>Fusarium moniliforme</i> , mediante la utilización de propóleo.....	45

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfico 1	Comparación de la desviación estándar que presentó la actividad del propóleo de la FESC sobre <i>Fusarium moniliforme</i> y <i>Aspergillus flavus, niger</i> y <i>ochraceus</i>	41
Gráfico 2	Comparación de la actividad del propóleo originario de FESC a diferentes concentraciones, sobre cada una de las especies fúngicas.....	42
Gráfico 3	Comparación de la desviación estándar que presentó la actividad del propóleo de Hidalgo sobre <i>Fusarium moniliforme</i> y <i>Aspergillus flavus, niger</i> y <i>ochraceus</i>	42
Gráfico 4	Comparación de la actividad del propóleo originario de Hidalgo a diferentes concentraciones, sobre cada una de las especies fúngicas.....	43
Gráfico 5	Comparación de desviación estándar que presentó la actividad del propóleo de Toluca sobre <i>Fusarium moniliforme</i> y <i>Aspergillus flavus, niger</i> y <i>ochraceus</i>	43
Gráfico 6	Comparación de la actividad del propóleo originario de Toluca a diferentes concentraciones, sobre cada una de las especies fúngicas.....	44
Gráfico 7	Concentración de micotoxinas que presentó <i>Aspergillus flavus, niger</i> y <i>Fusarioum moniliforme</i> en placas con EEP oriundo de FESC así como placas control.....	46

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Taxonomía de <i>Aspergillus spp</i>	3
Tabla 2	Taxonomía de <i>Fusarium spp</i>	7
Tabla 3	Micotoxinas por <i>Aspergillus</i>	12
Tabla 4	Micotoxinas por <i>Fusarium</i>	12
Tabla 5	Unidades de producción que reportan venta de propóleo por entidad federativa	17
Tabla 6	Principales componentes químicos del propóleo.....	18
Tabla 7	Lectura de la prueba de inhibición del crecimiento radial utilizando EEP proveniente de FESC, Hidalgo y Toluca, sobre los géneros <i>Aspergillus</i> y <i>Fusarium</i>	38
Tabla 8	Porcentaje de inhibición del crecimiento de los géneros, <i>Aspergillus</i> y <i>Fusarium</i> , utilizando EEP proveniente de FESC UNAM.....	40
Tabla 9	Porcentaje de inhibición del crecimiento de los géneros, <i>Aspergillus</i> y <i>Fusarium</i> , utilizando EEP proveniente de Hidalgo.....	40
Tabla 10	Porcentaje de inhibición del crecimiento de los géneros, <i>Aspergillus</i> y <i>Fusarium</i> , utilizando EEP proveniente de Toluca.....	41
Tabla 11	Lectura de la prueba de extracción de micotoxinas,	45
Tabla 12	Información general de los antifúngicos utilizados en la prueba de inhibición del crecimiento radial.....	59

RESUMEN

La creciente incidencia de contaminación en diversos sectores por hongos productores de micotoxinas, así como el incremento de resistencia a los tratamientos convencionales contra estos mohos y la tendencia por terapias alternativas de origen natural contra estos microorganismos, ha despertado el interés de la comunidad del área de la salud y la investigación por ampliar el conocimiento que se tiene acerca de estos temas.

Los hongos se pueden encontrar en cualquier parte, en los suelos, aire, agua, lo cual representa un serio problema, al ser fuente de infección tanto para plantas como para animales y seres humanos. La Micotoxicosis, es la intoxicación por la ingesta de alimentos contaminados por hongos filamentosos, los cuales tienen la capacidad de producir metabolitos tóxicos (micotoxinas). Los géneros más importantes, productores de este tipo de toxinas son: *Aspergillus spp.* y *Fusarium spp.* Y dado que hasta ahora no se conoce un tratamiento específico para la eliminación y/o control de estos metabolitos, este trabajo pretende determinar si el propóleo, una sustancia natural elaborada por las abejas melíferas (*Apis mellifera*), puede considerarse una alternativa eficaz que no presente efectos colaterales en el humano ni cambios o alteraciones en el valor nutritivo de los alimentos.

Se le confieren diversas propiedades terapéuticas al propóleo, como son: el ser antimicótico, sin embargo estas cualidades dependen de la calidad y proporciones de los elementos que lo constituyen relacionados directamente con su origen geográfico; por ello se trabajó con tres propóleos de diferentes zonas geográficas, los cuales son: Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (FESC), Hidalgo y Toluca, determinando la CMI por el método de dilución en placa de 24 pozos, una mayor actividad por parte del propóleo de FESC ante los géneros de *Aspergillus* y *Fusarium*; obteniendo una CMI sobre *Fusarium moniliforme* de 12.5 mg/mL y un porcentaje de inhibición $\geq 46\%$ para el género de *Aspergillus*.

Debido a que la investigación sobre propóleos Mexicanos es limitada, este trabajo se considera una aportación significativa a la ciencia para iniciar una línea de estudios sobre este producto natural capaz de inhibir el crecimiento de hongos patógenos para el ser humano.

Palabras clave: Propóleo, Micotoxinas, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus* y *Fusarium moniliforme*

I. INTRODUCCIÓN

Generalidades de los hongos

Se acepta que la palabra hongo deriva del griego: *mikes* y del plural latino: *fungi*, hongos (Laurá de Calafell *et. al.*, 1997). Sin embargo debido a su gran número y diversidad, no es posible de manera precisa definirlos, por lo tanto se prefiere hablar de sus principales características, como son:

- Organismos eucariontes, con núcleos organizados y membrana nuclear bien definida.
- Aerobios, Quimiotrópicos, Heterótrofos.
- Membrana celular bien organizada y su principal componente lipídico es el ergosterol (Franco, 2006).
- La pared celular básicamente formada por quitina (N-acetilglucosamina), celulosa, glucanas, mananas y algunos glicopéptidos (Bonifaz, 2012).
- Su reproducción puede ser sexual o asexual.
- Pueden ser unicelulares los cuales se conocen como levaduras o multicelulares, llamados filamentosos.
- Macro o microscópicos.

Los hongos son organismos ubicuos, se pueden encontrar en suelos, aire, agua; como recicladores biológicos, fuente de alimento, contaminantes, proveedores de compuestos con actividad biológica o como fuente de infección para animales y seres humanos (Franco, 2006). Pueden causar en el humano: hipersensibilidad como alergias, micosis e intoxicaciones conocidas como micotoxicosis y micetismos (Uribarren y Castañón, 2012).

Hongos como contaminantes

Los hongos contaminantes al ser microorganismos saprofitos representan un serio problema. Si bien es cierto que la mayoría de estos son inocuos hay que tomar en cuenta que algunos de ellos, cuando soportan temperaturas de 37°C o más, tienen la capacidad de realizar cambios metabólicos y se pueden convertir en agentes oportunistas, siempre que estén en contacto con un huésped. Por lo tanto es significativo reconocer este tipo de hongos (Bonifaz, 2012).

Al estar distribuidos ampliamente y ya que por lo general se transportan en forma de esporas o conidios a través del aire, suelen provocar cuadros de hipersensibilidad presentando alergias, por lo que son considerados como alérgenos. Uno de los principales hongos alérgeno es *Aspergillus* (Bonifaz, 2012).

Otro enfoque de los hongos contaminantes radica en la alimentación humana y animal ya que gran parte se basa en el consumo de granos y sus derivados, los cuales son frecuentemente invadidos por hongos y causan diferentes problemas, entre ellos la contaminación con sustancias tóxicas producidas por los mismos llamadas Micotoxinas. Es por ello que se requiere información sobre los hongos que invaden a estos productos y sus metabolitos tóxicos, con el fin de conocer la calidad sanitaria de los granos, la condición biológica de las semillas y prevenir los daños ocasionados por estos microorganismos (Moreno, 1998 y Bauza, 2007).

Las evidencias que se tienen sobre la importancia de los diferentes hongos toxigenicos que invaden los granos indican que los géneros más importantes son: *Aspergillus sp.*, *Fusarium sp.* y *Penicillium sp.*, lo cual ya había sido reportado desde 1966 por Brook y White . Especies de estos géneros, mas algunas de los géneros *Stachybotrys*, *Pithomyces* y *Rhizoctonia*, son las que más frecuentemente se han encontrado involucradas en casos de micotoxicosis (Lazo y Sierra, 2008).

En la actualidad se ha identificado que la presencia de *Aspergillus* y *Fusarium* en granos causa deterioro, mala calidad y una reducción en su rendimiento, debido a la capacidad de producir micotoxinas también están relacionadas con enfermedades en humanos y en animales que los consumen; por lo que se consideran los géneros más importantes para su estudio (García *et.al.*, 2007 y Fernández, 1990.).

Aspergillus spp.

El género *Aspergillus* comprende alrededor de 180 especies, son hongos filamentosos, hialinos y ubicuos. Se reproducen asexualmente por conidios (Uribarren y Castañón, 2012), sin embargo se ha descubierto que estos hongos llevan a cabo una fase de reproducción sexual, por lo que se ubican dentro de la división *Ascomycetes* Tabla 1, debido a que algunas presentan estados telemorficos (sexuados) ascosporados (Bonifaz, 2012).

Tabla 1 Taxonomía de *Aspergillus spp.*

Phylum	<i>Ascomycota</i>
Clase	<i>Eucomycetes</i>
Orden	<i>Eurotiales</i>
Familia	<i>Trichocomaceae</i>
Género	<i>Aspergillus</i>
Especies	<i>candidus, clavatus, fumigatus, flavus, glaucus, niger, ochraceus, terreus, versicolor, etc.</i>

Fuente: *Adaptado* de Bonifaz, (2012).

La palabra *Aspergillus* fue originalmente usada por Micheli a principios del siglo XVIII (1729), por la similitud microscópica que tiene con el *Aspergillus* (del latín *asperjar*, rociar o esparcir), o hisopo, instrumento que se usa en las ceremonias religiosas para la bendición. (Bonifaz, 2012)

Ecología y distribución

Las diversas especies oportunistas de *Aspergillus*, ocupan el primero o segundo lugar dentro de los hongos contaminantes del ambiente; se aíslan con frecuencia de aire, tierra, plantas, materia orgánica en descomposición y en especial contaminan alimentos, principalmente los que contienen carbohidratos y fibras. Se han aislado conidios de globos de aire de las capas superiores de la atmósfera, de la nieve del Antártico y de los vientos del Sahara (Rippon, 1990 y Bonifaz, 2012).

Las especies oportunistas son en promedio 20 y las más reportadas como causantes de cuadros patológicos son siete: *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus glaucus* y *Aspergillus versicolor* (Bonifaz, 2012).

Enfermedad clínica

En México el primer caso reportado de una aspergilosis pulmonar fue en 1951 por González-Ochoa (Bonifaz, 2012). Hoy en día se reconoce que *Aspergillus* puede causar enfermedad en el humano y animales, manifestándose principalmente en (Uribarren y Castañón, 2012):

Introducción

- a) Hipersensibilidad. En estos casos *Aspergillus* actúa como lo harían otros antígenos ambientales por ejemplo, polvo o pólenes ocasionando desde una rinitis alérgica, hasta un asma crónico severo.
- b) Intoxicación por ingesta de metabolitos fúngicos (micotoxicosis). En estos casos, sustancias como las aflatoxinas producidas durante el crecimiento de *Aspergillus flavus* en alimentos, puede causar daños a diversos órganos.
- c) Invasión (micosis). El sufijo “osis” se refiere a enfermedad o invasión. A pesar de la diversidad de sustancias potencialmente patógenas, las infecciones humanas generalmente requieren de factores predisponentes.

El pronóstico de la Aspergilosis depende casi por completo del tipo de enfermedad provocada y del estado fisiológico del paciente (Rippon, 1990 y Bonifaz, 2012).

Algunas especies del genero *Aspergillus* son parte de la flora habitual de diversas zonas del cuerpo como orofaringe, fosas nasales, piel, saco lagrimal, oído y tubo gastrointestinal, por lo que su aislamiento debe tener correlación clínica (Bonifaz, 2012).

Identificación en el laboratorio

Existen diversas muestras, como son esputo, lavado bronquial, exudados y fragmentos de biopsia, las cuales se trabajan en dos partes, para su observación y cultivo (Bonifaz, 2012).

- ✓ Examen directo: Los procedimientos y el aspecto del material varia ligeramente de acuerdo con la forma de la enfermedad (Rippon, 1990 y Bonifaz, 2012), sin embargo lo más utilizado, es colocar la muestra entre un portaobjetos y un cubreobjetos; aclarar con hidróxido de potasio al 10% o teñir con azul de algodón, permitiendo en ocasiones visualizar la hifas hialinas, septadas y las cabezas aspergilaes (Uribarren y Castañón, 2012).
- ✓ Cultivo: Se debe realizar en los medios ordinarios como Agar Sabouraud, Agar Dextrosa Papa y Agar Czapek, no es recomendable utilizar medios con antibióticos, porque las especies de *Aspergillus* se inhiben con la ciclohexamida (Bonifaz, 2012).

Introducción

De acuerdo al objetivo que se presenta en este trabajo, las especies de nuestro interés son: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* y *Aspergillus ochraceus*; por lo que hablaremos de sus principales características micológicas.

- *Aspergillus flavus*

Las colonias presentan un micelio basal plano, ilimitado, polvoroso o aterciopelado. Las cabezas conidiales son abundantes, radiadas, de color amarillo intenso a amarillo-verdoso; al reverso algunas cepas producen pigmento café ligeramente difusible. Se ha registrado formación de esclerotes en colonias viejas o en medios pobres, estos cambian a rojo castaño (Bonifaz, 2012 y Rippon, 1990).

Al microscopio se observa micelio macrosifonado, hialino y tabicado; las cabezas aspergilaras llegan a medir hasta 100 μm de diámetro, compuestas por conidióforos largos de 80 – 100 μm , generalmente de paredes gruesas, no pigmentados, con vesículas redondas de 25 – 45 μm , de las cuales nacen dos series de fiálides biseriadas, las primeras de 8 – 10 μm y las subsecuentes de 5 – 6 μm ; de estas últimas nacen microconidios redondos visiblemente equinulados Figuras 1 y 2 (Bonifaz, 2012).

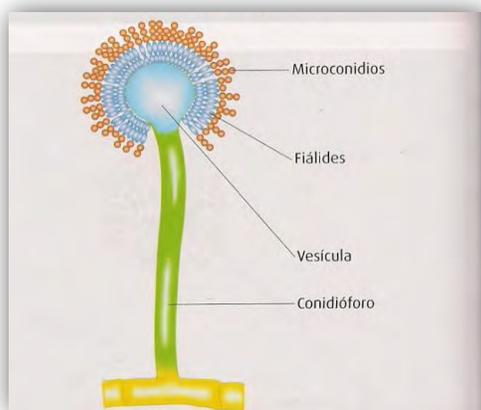


Figura 1. Estructura de *Aspergillus flavus* (Tomado de Bonifaz, 2012).

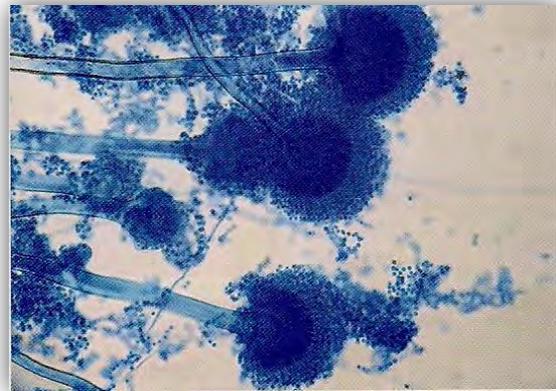


Figura 2. *Aspergillus flavus* Tinción azul de algodón 40x (Tomado de Bonifaz, 2012).

- *Aspergillus niger*

Se observan colonias que se desarrollan con rapidez transformándose en colonias planas, granulosas e ilimitadas; al reverso no presentan pigmento (Bonifaz, 2012). El micelio basal compacto es blanco a

Introducción

amarillo al inicio y posteriormente de color negro. Hay olor mohoso característico producido por el hongo (Rippon, 1990 y Bonifaz, 2012).

Al microscopio se observan hifas tabicadas de nutrición y reproductivas siendo estas últimas más anchas, las cuales terminan con las clásicas cabezas aspergiliares de 80 – 200 μm de diámetro, compuestas por conidióforos cenocíticos largos de 100 – 200 μm , lisos e incoloros. De las vesículas redondas de 25 – 100 μm de diámetro nacen dos series de fialides en un ángulo de 360° (biseriadas); las primeras de 8 – 10 μm y las segundas de 5 – 7 μm , de estas nacen microconidios redondos o elípticos, negros Figuras 3 y 4 (Bonifaz, 2012).

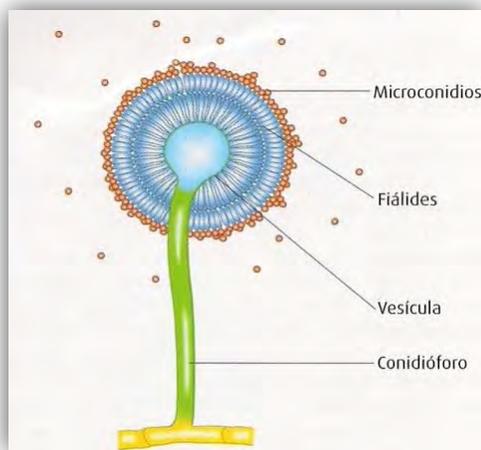


Figura 3. Estructura de la cabeza conidial de *Aspergillus niger* (Tomado de Bonifaz, 2012)



Figura 4. *Aspergillus niger* a 40x (Tomado de Bonifaz, 2012).

- *Aspergillus ochraceus*

Colonia de crecimiento micelial lento, circular, aplanado, color amarillo intenso a claro, áspero semeja serrín en granitos, crecimiento en anillos pronunciados, la periferia posee micelio blanco-amarillo y borde liso. Presenta formación de esclerocios. (Ramírez, 2006).

Cabeza conidial globosa de 800 μm de diámetro. Conidióforo mide 1 mm de longitud por 11 μm de diámetro, la vesícula es globosa de pared delgada, mide 40 μm de diámetro. Esterigmata cubre la vesícula de uno o dos series; esterigmata primario mide 15 x 5 μm y el secundario 8 x 2 μm . Conidios

Introducción

globosos miden 2.5 μm en diámetro, áspero Figura 5. Formación de esclerocios, globosos a ovalados de 1 mm de diámetro (Ramírez, 2006).



Figura 5. Observación microscópica de *Aspergillus ochraceus* (Tomado de González, 2009).

Fusarium spp.

Fusarium spp. son hifomicetos ubicuos, gracias a su capacidad de crecer en una amplia gama de sustratos y a sus mecanismos eficientes para la dispersión. Se han identificado más de 50 especies de *Fusarium*, incluyendo patógenos vegetales y animales (Giraldo *et. al.*, 2010). Muchas especies requieren condiciones específicas para desarrollarse adecuadamente y otras sufren mutaciones rápidamente. Esto explica la cantidad de clasificaciones y especies que hay. Actualmente, la mayoría de estas clasificaciones se basan en las características macro y microscópicas del cultivo. Se consideran un género anamórfico dentro de los Ascomicetos, su taxonomía se muestra en la Tabla 2 (Domínguez, 2010).

Tabla 2. Taxonomía de *Fusarium spp.*

Phylum	<i>Ascomycota</i>
Clase	<i>Deuteromycete</i>
Orden	<i>Hypocreales</i>
Familia	<i>Hypocreaceae</i>
Género	<i>Fusarium</i>
Especies	<i>oxysporum, solani, verticilloides, roseum, nivale, graminearum, trincitum, poae, acuminatum, etc.</i>

Fuente: *Adaptado* de Domínguez, 2010.

Ecología y distribución

El género *Fusarium* es de distribución cosmopolita en todos los tipos de climas y tiene un amplio intervalo de hospederos, principalmente frutos, verduras, cereales y granos (Barrera y García, 2008). Se encuentra frecuentemente aislado como saprofitos en aguas, suelos y substratos orgánicos en descomposición (Valencia, 2009).

Fusarium en humanos, animales y plantas.

Se considera saprófito y patógeno ocasional para plantas, animales y humanos, produciendo infecciones o micotoxicosis (Giraldo *et. al.*, 2010). Las especies responsables de los casos de infección en humanos, animales y plantas son *Fusarium oxysporum* junto a *Fusarium solani* y *Fusarium moniliforme* (Valencia, 2009).

Fusarium es conocido actualmente como un patógeno emergente de humanos y animales; actualmente representa el segundo hongo mas frecuente, causante de infección fúngica invasiva en pacientes inmunocomprometidos (Valencia, 2009). La fusariosis es una infección oportunista producida por las diferentes especies del hongo hialino *Fusarium* que se presenta, principalmente, en pacientes con procesos hematológicos malignos. Se caracteriza por tener manifestaciones clínicas muy variables y una respuesta tórpida al tratamiento (García y Martínez, 2010). Tiene como puertas de entrada la piel, las uñas, la vía aérea, el sistema gastrointestinal y los ojos. Como en toda infección, la gravedad y curso dependen del número de microorganismos y de la profundidad de la penetración, sumado a la respuesta inmunitaria del individuo. El mecanismo de invasión es similar al de la aspergilosis diseminada y los factores de riesgo son igualmente compartidos (Giraldo *et. al.*, 2010).

Se han descrito una serie de características celulares y moleculares como la producción de toxinas, enzimas y factores de adherencia entre las especies de *Fusarium* que les confieren diferentes grados de virulencia (Valencia, 2009); por ejemplo los tricotecenos, que suprimen la inmunidad humoral y celular, la capacidad de adherirse a material protésico, producir proteasas y colagenasas así como ruptura de tejidos y (Giraldo *et. al.*, 2010).

Introducción

Por otro lado este género es considerado el principal agente causal del marchitamiento vascular, enfermedad que afecta una gran variedad de cultivos economicamente importantes alrededor de todo el mundo. La presencia de especies fitopatógenas de *Fusarium sp.* en el suelo es uno de los principales impedimentos para la siembra continua de los campos (Valencia, 2009).

Fusarium spp. Muestra un perfil típico de relativa resistencia a la mayoría de los agentes antifúngicos; sin embargo, las diferentes especies pueden tener distintos patrones de sensibilidad, de ahí la importancia de su clasificación y pruebas de sensibilidad antifúngica (Giraldo *et. al.*, 2010).

Identificación en el laboratorio

Se trabajan diversos tipos de muestras, como son esputo, lavado bronquialveolar, exudados, fragmentos de biopsia, etc. El material recolectado se divide en dos partes para su observación y cultivo.

- ✓ Examen directo: A partir de preparaciones en fresco de las secreciones, macerados de tejido o tomas de cultivo, se tiñe con hidróxido de potasio al 10% y se observan las hifas hialinas, septadas, ramificadas (Giraldo *et. al.*, 2010).

- ✓ Cultivo: Se evidencian colonias en diversos medios de cultivo, como Agar Sabouraud y PDA. La velocidad de crecimiento, la morfología y la pigmentación de la colonia, son datos importantes para la identificación (Giraldo *et. al.*, 2010).

- *Fusarium moniliforme (verticillioides)*

Las colonias son de color blanquecino a tonalidades que van de rosa a púrpura. El color al reverso varía de crema a lila, vino tinto o púrpura. El micelio aéreo puede ser abundante y de aspecto algodonoso (Domínguez, 2010).

Al microscopio se observan microconidios ovoides, en largas cadenas o en falsas cabezas (Valencia, 2009). Su tamaño es de 7 – 10 x 2.5 - 3.5 μm y pueden tener uno o dos septos. Los conidióforos nacen de la hifa, son largos y escasamente ramificados Figura 7. Las células conidiogénicas son monofíalides, delgadas y largas (Domínguez, 2010). Los macroconidios son escasas (Valencia, 2009) ligeramente

Introducción

fusiformes, pueden tener entre tres y siete tabiques, su tamaño es de $31 \times 58 \times 2.7 - 3.6 \mu\text{m}$ Figura 6 (Domínguez, 2010).

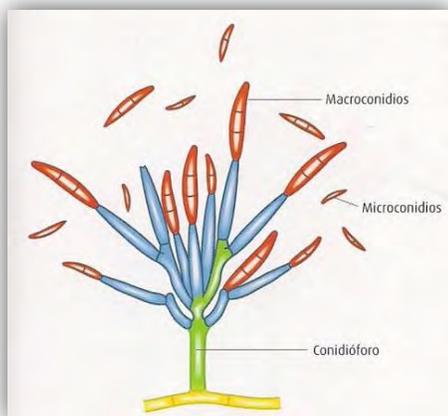


Figura 6. Estructura de *Fusarium moniliforme* (Tomado de Bonifaz, 2012)

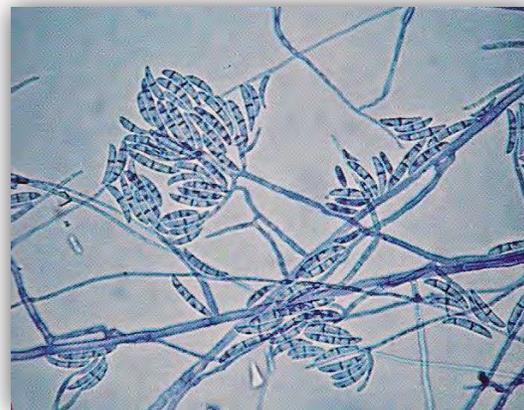


Figura 7. *Fusarium moniliforme* Tinción azul de algodón 40x (Tomado de Bonifaz, 2012).

Micotoxinas

Micotoxinas, deriva de las palabras griegas *mikes* (hongo) y *toxina* (veneno).

Son un grupo muy amplio de compuestos altamente tóxicos, resultado del metabolismo secundario de algunas especies fúngicas en determinadas condiciones (Robledo *et. al.*, 2001 y Martínez y Anadón, 2012). Ya que los hongos toxigenicos son cosmopolitas, las micotoxinas son de igual forma pululantes ambientales presentes virtualmente en muchas partes del mundo e inducen efectos tóxicos tras inhalación o ingestión tanto para el hombre como para animales (Martínez y Anadón, 2012).

La historia de las intoxicaciones por micotoxinas data de la edad media, cuando fueron frecuentes las epidemias de alucinaciones, delirio, convulsiones y gangrena; en el año de 1850 se identificaron a los alcaloides del cornezuelo de centeno (productos secundarios del hongo *Claviceps purpurea*) como agentes causales de la enfermedad. Se volvió a tener interés por las micotoxinas a principio de 1960 en Reino Unido cuando se produjo la muerte de miles de pavos y patos por la enfermedad X del pavo por contaminación de harina de cacahuete contaminada por una micotoxina llamada aflatoxinas (Martínez y Anadón, 2012).

Introducción

Las micotoxinas son moléculas relativamente pequeñas (Peso molecular < 700 g/mol), se suelen formar al final de la fase exponencial o bien al principio de la fase estacionaria del crecimiento del hongo, Figura 8, durante la ruta policetónica, o bien otras rutas biosintéticas más complejas, relacionadas con un menor número de especies fúngicas capaces de elaborar las micotoxinas (Soriano, 2007).

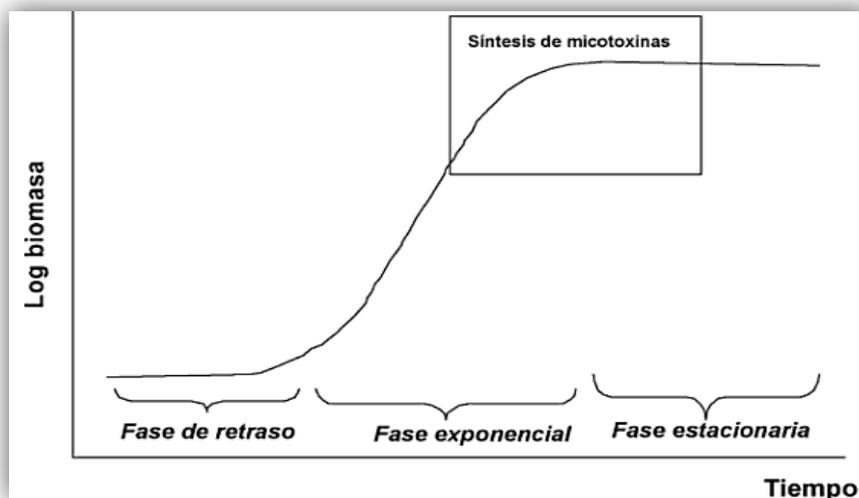


Figura 8. Crecimiento fúngico y localización de la síntesis de micotoxinas (Tomado de Soriano, 2007).

Es importante la correcta identificación de la toxina causante de una micotoxicosis, ya que:

- 1) La presencia del hongo no indica por sí mismo que exista la producción de toxinas.
- 2) Las toxinas pueden perdurar en el sustrato aunque el hongo que la ha producido no persista.
- 3) El hongo puede ser capaz de producir más de una toxina.
- 4) La toxina puede estar producida por hongos de diferentes géneros.

Se debe tener en cuenta que la mayoría de las micotoxinas son termo resistentes, manteniendo su toxicidad luego de procesos como la pelletización (Bauza, 2007 y Martínez y Anadón, 2012).

Los hongos productores de micotoxinas se concentran en la división *Ascomycota*, entre los principales géneros se encuentran *Penicillium*, *Aspergillus* y *Fusarium* (Soriano, 2007).

Han sido identificadas unas 300 micotoxinas, sin embargo las que se pueden encontrar en forma más frecuente como contaminantes naturales en los alimentos para animales y humanos son: aflatoxinas, ocratoxinas, zearalenona, toxinas tricotecenas como toxina T2, DON, alcaloides del cornezuelo del centeno, fumonisinas y las micotoxinas del “hongo de la pradera” (Bauza, 2007).

Introducción

En las siguientes tablas se muestran el tipo de micotoxinas producidas por los géneros de nuestro interés *Aspergillus* y *Fusarium*.

Tabla 3. Micotoxinas por *Aspergillus*

Toxina	Hongo	Fuente de contaminación	Tipo de toxicidad	Afecta a:
Alflatoxina B1, B2, G1 y G2	<i>A. flavus</i> <i>A. parasiticus</i> <i>A. nomius</i>	Cereales: maíz, sorgo, cebada, avena. Oleaginosas: nuez, cacahuete, girasol. Huevos, lácteos y cárnicos.	Hepatotóxica (carcinogénica)	*Hombre *Pavos *Gallinas *Cerdos *Truchas
Ocratoxina	<i>A. ochraceus</i> <i>A. alliaceus</i> <i>A. osteanus</i>	Granos: maíz, centeno y trigo	Hepatotóxica Abortiva	*Pollos *Cerdos *Ganado bovino
Ácido ciclopiazónico	<i>A. flvus</i> <i>A. versicolor</i> <i>A. tamarii</i>	Maíz, cacahuete (maní), mijo, huevo y leche	Neurotóxica	*Ratas *Perros *Cerdos *Hombre
Esterigmatocistina	<i>A. versicolor</i> <i>A. nidulans</i>	Cereales: avena, trigo, maíz Quesos	Carcinogénica	*Aves de corral.

Fuente: Adaptado de Bonifaz, 2012).

Tabla 4. Micotoxinas por *Fusarium*

Toxina	Hongo	Fuente de contaminación	Tipo de toxicidad	Afecta a:
Fusarina	<i>F. roseum</i>	Frutos y verduras semillas	Estrogénica y abortiva Inmunodepresora	*Cerdos *Ganado bovino
Tricotecenos Fusarina T-2 Fusarina HT-2 DAS	<i>F. trincitum</i> <i>F. poae</i>	Maíz, trigo, cebada, avena, sorgo, arroz, ajonjolí, piensos.	ATA Irritación y necrosis dérmica Gastrotóxica Neurotóxica Carcinogénica	*Ganado vacuno *Hombre
Zaralenona o Toxina F-2	<i>F. graminearum</i> <i>F. verticilloides</i> <i>F. oxysporum</i>	Frutos y semillas	Estrogénica Abortiva	*Cerdo *Ganado bovino
Vomitoxina, toxina Rd o desoxinivalenol	<i>F. graminearum</i> <i>F. acuminatum</i> <i>F. avenaceum</i>	Maíz, trigo, cebada, avena	Gástricos (Nauseas y vómitos) Neurotóxica	*Cerdos *Perros *Gatos *Patos
Butenolida	<i>F. nivale</i>	Avena y cereales	Neurotóxica Gastrotóxica	*Caballos *Hombre
Fumonisinias	<i>Fusarium spp.</i>	Maíz	Neurotóxica Gastrotóxica Neumotóxica	*Caballos *Cerdos *Ratas *Hombre

Fuente: Adaptado de Bonifaz, 2012).

Efectos de las micotoxinas sobre los consumidores

La micotoxicosis, es la intoxicación por la ingesta e inhalación de metabolitos tóxicos llamados micotoxinas; aunque la proporción de toxina sea muy baja, la serie de trastornos que ocasiona llegan a ser muy variados (Bonifaz, 2012).

Las micotoxinas en la dieta pueden causar diversos efectos adversos sobre la salud del hombre y gran variedad de especies animales (Soriano, 2007), por ello debemos tener en cuenta la concentración y el tiempo de exposición a una determinada micotoxina, ya que las micotoxinas pueden inducir una de las siguientes formas de intoxicación (Martínez y Anadón, 2012):

- Micotoxicosis aguda: se produce cuando se consumen micotoxinas a concentraciones desde moderadas a altas, causando manifestaciones específicas de enfermedad aguda incluso la muerte.
- Micotoxicosis crónica: producida por la ingesta de muy bajas concentraciones de toxina causando un aumento de la susceptibilidad a otras infecciones o enfermedades.

Los síntomas causados por las micotoxinas suelen ser tan diferentes unos de otros como lo son las propias estructuras químicas de dichas toxinas y dependerán de las especies fúngicas implicadas, los mecanismos o modos de acción, el metabolismo y los mecanismos de defensa del organismo vivo afectado (Soriano, 2007 y Martínez y Anadón, 2012). La inmunosupresión producida se manifiesta como una disminución de los linfocitos T o B, supresión de los anticuerpos, retraso en la actividad de los macrófagos y neutrofilos o bien disminución de la actividad del complemento (Soriano, 2007).

La Agencia Internacional de Investigación sobre el cáncer (IARC) clasifica varias micotoxinas como carcinogénicas o potencialmente carcinogénicas para el hombre, entre las que se encuentran la aflatoxina B₁, B₂, G₁, G₂, fumonisina B₁, B₂ y Toxina T-2 (Soriano, 2007).

Medidas de detoxificación

Un mecanismo de detoxificación masiva es la utilización de secuestrantes que son sustancias tanto minerales como biológicas, que sacan de circulación a la toxina. Caracterizados por su pequeño tamaño

Introducción

y una gran superficie de contacto. Entre estos productos se mencionan ciertos silicatos, (alúminosilicatos de calcio y sodio hidratados). Uno de los inconvenientes de su actividad, es que al no ser específica puede adsorber vitaminas, minerales y aminoácidos, además de las micotoxinas. La capacidad secuestrante del carbón activado depende del tamaño del poro, área de superficie, estructura de la micotoxina y dosis (Tapia *et. al.*, 2010), ha demostrado ser eficaz contra la toxina T-2 reduciendo la capacidad de circulación entero-hepática, siendo también efectivo contra aflatoxinas, fumonisina y ocratoxina (Bauza, 2007 y Soriano, 2007).

El glucomanano esterificado (EGM) es un azúcar complejo derivado de las paredes celulares de las levaduras *Saccharomyces cerevisiae*, así como el oligosacárido manano modificado (MOS) son considerados secuestrantes ventajosos y ecológicos. Ambos tipos de productos tienen un espectro más amplio de actividad, que incluye zearalenona, T-2 y OTA, además de las aflatoxinas. Se recomiendan soluciones de amplio espectro, en las que se combinan dos o más productos (Bauza, 2007).

Ante la detección de la presencia de micotoxinas en un alimento, la opción más segura es utilizar métodos de inactivación de las micotoxinas. Los mejores resultados de detoxificación química de aflatoxinas se han obtenido con amoníaco e hidróxido de calcio con lisina y metilamina, así como un solvente de extracción de micotoxinas, como es el caso del metoximetano (Bauza, 2007). Estos tipos de tratamiento y otros adicionales deben de ser integrados de forma preventiva en la implantación del sistema HACCP Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos (Soriano, 2007).

Propóleo

Definición

Propóleo deriva de las raíces griegas *pro* (en defensa de) y *polis* (ciudad), denotando el carácter defensivo que tiene esta sustancia y su aplicación en la construcción, aislamiento y protección de la colmena (Martínez, 2009).

Historia

El propóleo es conocido y utilizado por el hombre desde tiempos muy remotos. Fue empleado por los sacerdotes del antiguo Egipto que embalsamaron con él los cadáveres. Los médicos árabes lo empleaban como antiséptico y cicatrizante de heridas y como un desinfectante para la boca (Martínez,

2009). En el primer texto médico “*Libro de preparación de medicamentos para todas las partes del cuerpo humano*”, hallado en el papiro de Ebers, escrito hacia 1700 a.n.e., se hace mención de una cera negra (propóleo) como medicina. (Gonzales y Bernal, 1997).

Características generales

El Propóleo es un sustancia multifuncional de origen natural, resinosa, balsámica, gomosa, de consistencia viscosa, sabor acre, frecuentemente amargo, olor agradable dulce, su coloración es variada y puede poseer tonalidades amarillentas, verdes, rojizas, castaño o incluso casi negras. Esta diversidad de coloraciones, está asociada con diferencias en composición y propiedades físicas que dependen fundamentalmente del tipo de flora circundante de la colmena, así como del tipo de abeja que lo produzca (Gonzales y Bernal, 1997., Londoño *et. al.*, 2008 y Martínez, 2009).

Las abejas tienen el instinto de propolizar como medio de defensa contra las amenazas que presenta el medio externo, pasando a ser el propóleo junto con la cera, un material indispensable para la elaboración y mantenimiento de sus colmenas (Gonzales y Bernal, 1997 y Martínez, 2009). Es el “arma química” de las abejas contra los microorganismos patógenos; la presencia de esta sustancia al interior de la colmena proporciona un ambiente inadecuado para el crecimiento de bacterias y otros microorganismos (Palomino *et. al.*, 2010 y Londoño *et. al.*, 2008).

El propóleo es elaborado por las abejas melíferas (*Apis mellifera*), a partir de los brotes exudados de las cortezas, de las partículas resinosas que hay sobre las yemas de estas y diversos tejidos de las plantas que se hallan en la cercanías del lugar de emplazamiento del colmenar (Gonzales y Bernal, 1997 y Martínez, 2009). Los materiales una vez colectados valiéndose de sus mandíbulas y de un primer par de patas son triturados y ablandados mediante la secreción del ácido 10- hidroxidecanoico por las glándulas mandibulares (Gutiérrez, 2011) posteriormente son enriquecidos y mezclados con secreciones salivares y enzimáticas para finalmente ser transportados hacia la colmena (Martínez, 2009 y Palomino *et. al.*, 2010).

Producción de propóleo en México

La producción de propóleos en México es muy limitada Figura 9, debido al tipo de apicultura realizada en nuestro país, la cual se enfoca principalmente en la extracción de miel, así como a la falta de información por parte de los apicultores sobre el valor que esta resina posee y la técnica de su extracción, aunado a la falta de empresas que demanden su compra, lo cual contribuye al lento desarrollo de su producción y uso (SAGARPA, 2010). La mayor parte de su obtención está basada en el raspado interno que realiza el productor durante la revisión de sus colmenas, resultando así un propóleo de no muy buena calidad. Sin embargo, por ser un producto que da alternativas económicas al productor, mediante la capacitación y asistencia técnica se puede fomentar la producción utilizando la tecnología, a través de trampas que permitan coleccionar un propóleo de mejor calidad (Gonzales, 2010).

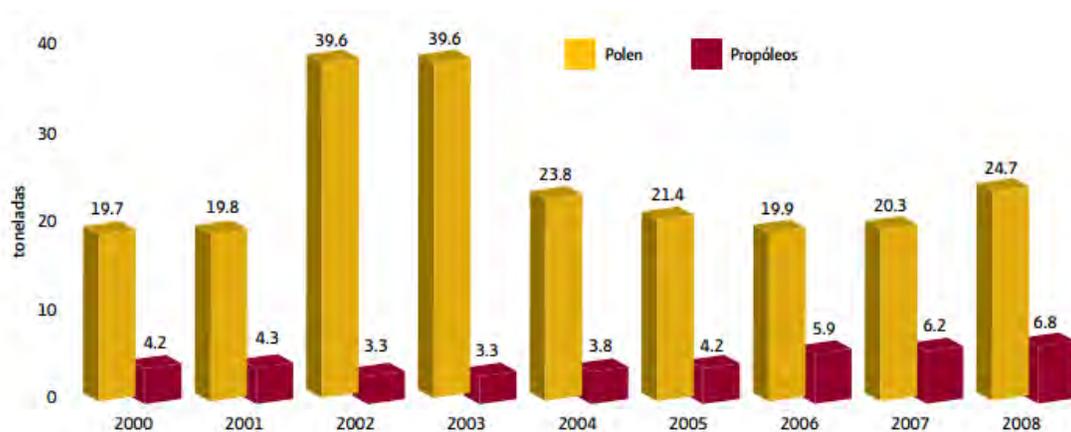


Figura 9 Producción de polen y propóleos en México (Tomado de SAGARPA, 2010)

La extracción y procesamiento del propóleo se ha estado realizando de forma aislada, por parte de algunos apicultores e industriales, mismos que lo emplean en la elaboración principalmente de jarabes y tinciones para su comercialización (SAGARPA, 2010). Actualmente, se ha consolidado y establecido como un área de oportunidad para incrementar los ingresos de los productores, ante un mercado interno en crecimiento y en el cual aún no se alcanza la autosuficiencia en estos productos para la demanda nacional (Gonzales, 2010).

Introducción

En la siguiente tabla se muestra la producción de propóleo por entidad federativa.

Tabla 5. Unidades de producción que reportan venta de propóleo por entidad federativa

Entidad	Unidad de producción	%
Michoacán de Ocampo	18	13.3
Veracruz	11	8.1
Colima	10	7.4
Puebla	10	7.4
Chiapas	10	6.7
Morelos	8	5.9
Zacatecas	8	5.9
Guerrero	7	5.2
Jalisco	7	5.2
México	7	5.2
Sinaloa	7	5.2
Chihuahua	6	4.4
Tlaxcala	5	3.7
Aguascalientes	4	3.0
Península de Yucatán	3	2.2
Distrito Federal	3	2.2
Guanajuato	3	2.2
Querétaro	3	2.2
Yucatán	2	1.5
Baja California	1	0.7
Hidalgo	1	0.7
Oaxaca	1	0.7
Quinta Roo	1	0.7
San Luis Potosí	1	0.7
Sonora	1	0.7
Tamaulipas	1	0.7

Fuente: Tomado de Instituto Nacional de Estadística y geografía, 2012).

Composición Química

La composición química de los propóleos es compleja y depende de varios factores como son: la región geográfica, el clima, el relieve, la vegetación natural, las cuencas hidrográficas y otros. La flora específica que rodea a la colmena es el sitio de recolección de las abejas (Gutiérrez, 2011).

El propóleo contiene una amplia variedad de compuestos químicos; se han identificado más de 300 (Martínez, 2009), sin embargo los componentes más significativos en este producto apícola son los que se muestran en la siguiente tabla (Gutiérrez, 2011).

Tabla 6. Principales componentes químicos del propóleo

Componentes	Ejemplos
Ácidos alifáticos	Ácido butírico, ácido fumárico, ácido oleico.
Ácidos orgánicos	Como el ácido benzoico C_6H_5-COOH , galico $C_7H_6O_5$
Ácidos fenólicos	Ácido cafeico $C_9H_8O_4$, cinámico $C_{11}H_{13}NO_2S_2$, pumarínico, insofenílico, fenílico
Aldehídos aromáticos	Vainillina $C_8H_8O_3$, isovainillina $C_8H_8O_3$
Cumarinas	Esculetol $C_9H_6O_4$, escopuletol
Flavonoides	Pinocembrina $C_{15}H_{12}O_4$, galangin $C_{15}H_{10}O_5$, pinobanksina $C_{15}H_{12}O_5$
Flavonas	Acacetina $C_{16}H_{12}O_5$, cresina amarilla, pectolinarigenina $C_{17}H_{15}O_6$, tetrocrisina $C_{16}H_{12}O_4$
Flavonoles	Izalquinina, kaempférido $C_{16}H_{12}O_6$, quercetina $C_{15}H_{10}O_7$, remnocitrina
Flavononas	Pinostrobina $C_{16}H_{14}O_4$, sakuranetina $C_{16}H_{14}O_5$
Flavonnoles	Pinobanksina, ferulico, sequiterpenos y las flavononas (principalmente la galangina $C_{15}H_{10}O_5$)
Alcoholes	Hidroquinona, glicerol, α -glicerofosfato, β -glicerofosfato
Terpenoides	Limoneno, cimenol
Vitaminas	Provitamina A y vitamina B3

Fuente: Adaptado de Gutiérrez, 2011).

Propiedades terapéuticas

Las propiedades terapéuticas del propóleo dependen de la calidad de este, así como de las proporciones de los elementos que la constituyen, los cuales se relacionan directamente con su origen geográfico (Gutiérrez, 2011).

Su modo de empleo o uso depende del tipo de disolvente empleado para su extracción, por esta razón los más recomendados son el etanol y propilenglicol (Martínez, 2009).

Los efectos de mayor interés, gracias a los cuales este producto ha ganado valor terapéutico, son (Gonzales y Bernal, 1997., Londoño *et. al.*, 2008 y Martínez, 2009):

- ✓ Actividad antimicrobiana (bacterias, hongos y virus).
- ✓ Actividad antiparasitaria.
- ✓ Actividad antiinflamatoria, cicatrizante y anestésica.
- ✓ Actividad antioxidante
- ✓ Actividad antitumoral y radioprotectora.
- ✓ Actividad vasoprotectora.
- ✓ Actividad inmunomoduladora.
- ✓ Actividad antimutágena

Las propiedades antimicóticas del propóleo han sido establecidas por numerosos autores, luego de considerar a los sesquiterpenos, sobre todo el bisabol y flavononas –especialmente la pinocembrina– como principales compuestos responsables de esta actividad (Gonzales y Bernal, 1997).

Adicionalmente, se han evaluado la actividad antimicótica de propóleos de diferentes regiones de Argentina, encontrando que la actividad contra los hongos fitopatógenos *Fusarium sp*, *Macropomina sp*, *Phomosis sp*, *Aspergillus niger* y *Thichoderma spp*, está relacionada con los flavonoides galangina y pinocembrina (Martínez, 2009).

Toxicidad

La actividad alérgica del propóleo es desconocida, sin embargo ha demostrado ser capaz de provocar reacciones de sensibilización en algunas personas, al manipularlo o utilizarlo en la terapéutica. Se ha visto en apicultores profesionales el padecimiento de una dermatosis específica a

esta profesión. Las regiones que más se afectan son las manos y ciertas zonas que entran en contacto con el propóleo, como la cara y el cuero cabelludo. En otras personas estas manifestaciones pueden presentarse de varias formas, desde crisis asmáticas (por inhalación del propóleo) hasta un exantema urticario papuloso generalizado al aplicarse tópicamente, para desaparecer poco tiempo después de eliminar el contacto con el producto.

La diversidad en la composición química de este producto apícola y su empleo generalizado en la industria, ha traído como consecuencia la necesidad de su control de calidad y normalización. Con este fin, se han desarrollado metodologías de trabajo establecidas por diferentes normas internacionales, entre las que se incluyen la norma IRAM-INTA del Instituto Argentino de Normalización-Subcomité de productos agroalimentarios del NOA (2004), la norma Ramal del Ministerio de Agricultura de Cuba (1994), y el reglamento técnico para la fijación de identidad y calidad de propóleos del Ministerio de Agricultura de Brasil (1999) (Palomino *et. al.*, 2010).

Investigación de propóleo en México.

En México la información científica respecto a la actividad biológica y composición química de sus propóleos es muy limitada; algunos artículos relacionados con el tema que se encontraron fueron los siguientes:

- ♣ Estudio de la actividad antifúngica de un extracto de propóleo de abeja *Apis mellifera* proveniente del Estado de México. Este trabajo concluye que el extracto etanólico al 15% de propóleo de la abeja *Apis mellifera* procedente del apiario de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM, tuvo un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *Candida albican*, *Cryptococcus neoformans*, y sobre el hongo filamentoso *Aspergillus fumigatus*, el cual fue demostrado mediante dos pruebas de susceptibilidad, lo cual sugiere el posible tratamiento de las enfermedades causadas por estos hongos (Londoño *et. al* 2008).
- ♣ Structural and genetic alterations of fungal cells caused by Mexican propolis. En dicho trabajo se demostró la actividad antifúngica de extractos etanólicos de propóleos de abejas *Apis mellifera* de México, al inhibir la formación del tubo germinativo de *C. albicans*. Por otro lado, se determinó el perfil químico de varios propóleos mexicanos, con resultados interesantes como la diversidad de contenido y diferentes niveles de actividades antifúngicas y antibacterianas (Quintero *et. al* 2011).

- ♣ Actividad antimicrobiana del propóleo recolectado por *Apis mellifera* y *Melipona beecheii* en el estado de Yucatán. El cual concluye que los extractos etanólicos de los propóleos de las dos especies de abejas *Apis mellifera* y *Melipona beecheii* mostraron efecto bacteriostático, pero limitado poder bactericida. Con relación a la actividad antifúngica, esta solo se presentó en el extracto etanólico del propóleo de *Apis mellifera* y en el aceite esencial del propóleo de *Melipona beecheii*, contra *Saccharomyces cerevisiae* en ambos casos como fungicida y fungistático (Delgado *et. al.*, 2008).
- ♣ Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de Extractos de Propóleos de la Huasteca Potosina (México). En este trabajo se demuestra que los extractos etanólicos tienen una mayor actividad antibacteriana en comparación con los extractos acuosos, siendo las bacterias Gram positivas más susceptibles que las bacterias Gram negativas, a los extractos etanólicos del propóleo. Sin embargo su actividad depende de la procedencia de los propóleos, del tipo de solvente empleado en su extracción y de la especie bacteriana sobre la cual se usan los extractos (Carrillo *et. al* 2011).

II. JUSTIFICACIÓN

Dado que en México existe una limitada investigación sobre sus propóleos y al saber que es una sustancia natural con diversas propiedades biológicas, se busca obtener información sobre su actividad antifúngica sobre *Aspergillus spp.* y *Fusarium spp.*, ya que estos hongos son considerados dentro de los principales contaminantes ambientales e importantes productores de micotoxinas; y así determinar si los propóleos pueden ser utilizados en el tratamiento de descontaminación de estos hongos.

III. OBJETIVOS

Objetivo general

Analizar *in vitro* la actividad antimicótica de propóleos con orígenes diversos, para determinar si estos inhiben el crecimiento de los hongos *Aspergillus* y *Fusarium*.

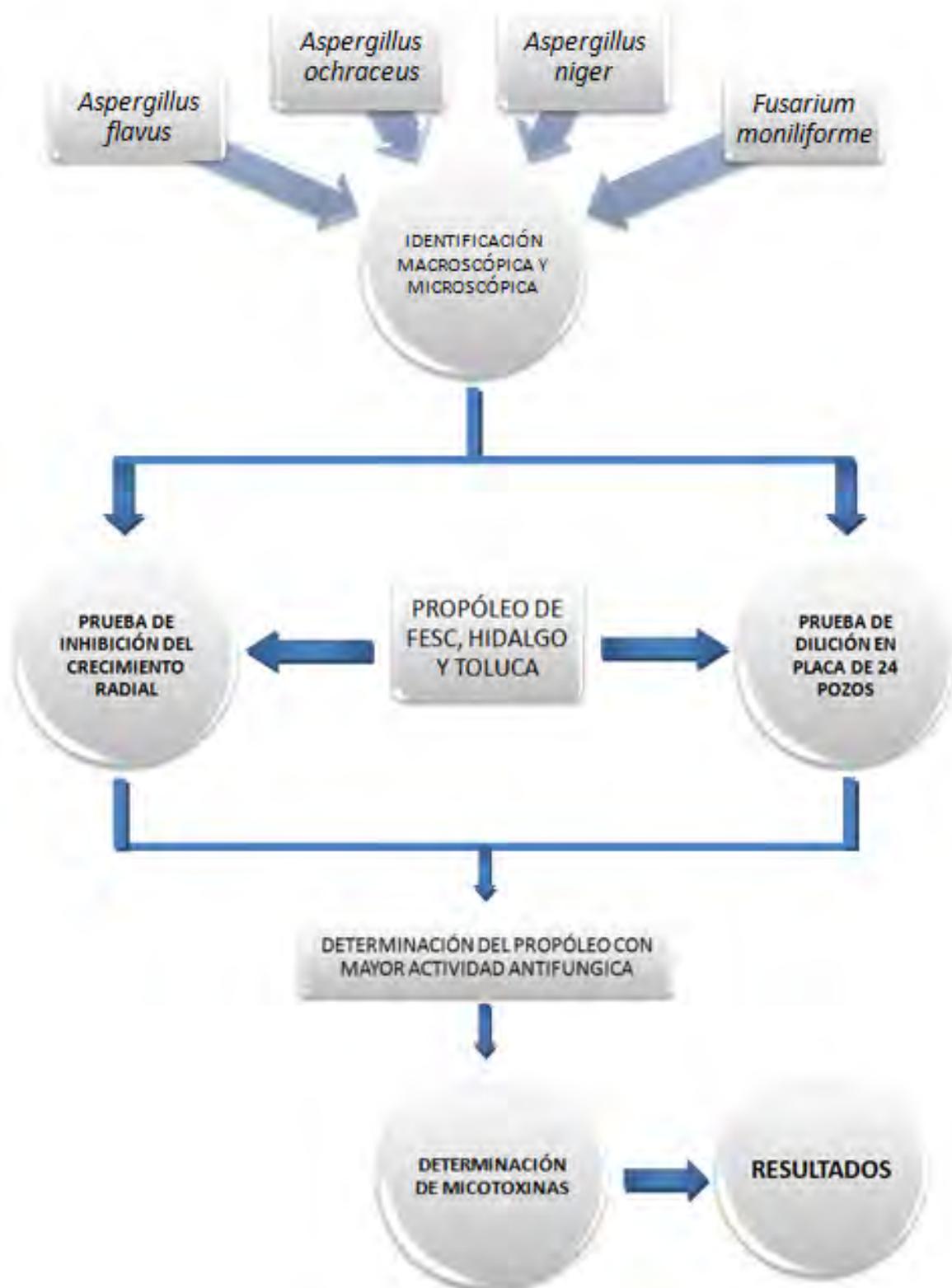
Objetivos particulares

- 1) Determinar de forma cualitativa el efecto inhibitorio que causa cada uno de los propóleos, sobre los géneros *Aspergillus* y *Fusarium*, mediante la prueba de inhibición del crecimiento radial.
- 2) Determinar la concentración mínima inhibitoria de cada propóleo sobre los géneros *Aspergillus* y *Fusarium*, utilizando el método de dilución en placa de 24 pozos.
- 3) De acuerdo al propóleo que presente mayor actividad antifúngica, se determinara la inhibición de producción de aflatoxinas en el género de *Aspergillus* y de fumonisinas en el género de *Fusarium*, mediante los métodos de Alfatest^R y Fumonitest^R respectivamente.

IV. HIPÓTESIS

Al ser el propóleo una sustancia con propiedades fungicidas y fungistáticas, este deberá inhibir el crecimiento de los hongos *Aspergillus* y *Fusarium* a una determinada concentración, por lo tanto no habrá producción de Aflatoxinas y Fumonisinias respectivamente.

V. DISEÑO EXPERIMENTAL



VI. MATERIALES Y MÉTODOS

Microorganismos

Se emplearon tres diferentes cepas de campo del género *Aspergillus* y una del género *Fusarium*. Las cepas de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* y *Fusarium moniliforme* fueron donadas por el Laboratorio 6 de Microbiología de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria (UIM) de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (FESC) UNAM. Mientras que la cepa de *Aspergillus ochraceus* fue donada por el laboratorio 14 de la misma Unidad.

Propóleos

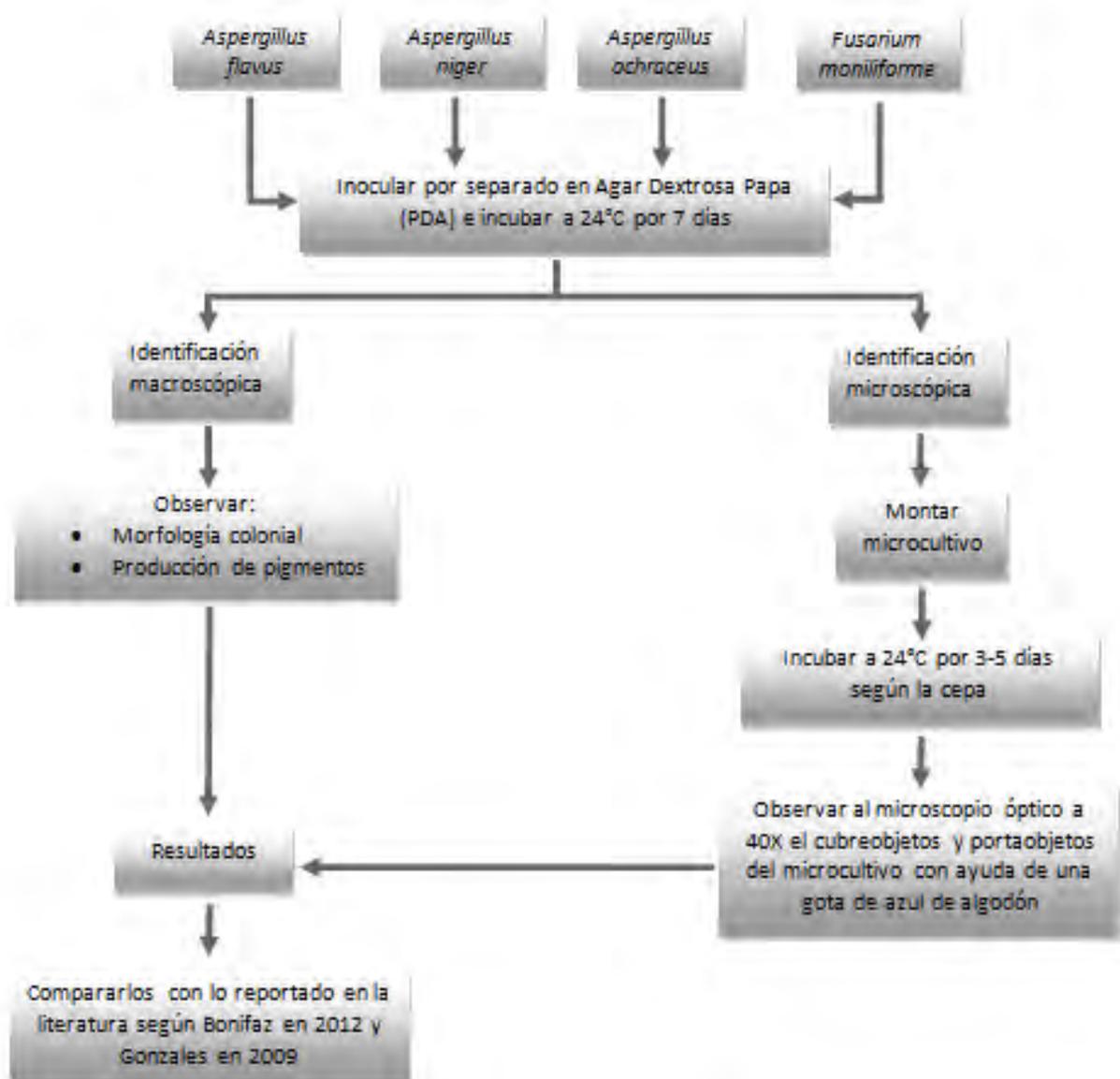
Se utilizaron tres extractos etanólicos de diferentes propóleos (EEP). El primero proveniente del apiario de la FES Cuautitlán UNAM, el cual fue procesado en el Laboratorio de Microbiología (Laboratorio 6) de la UIM de la FES Cuautitlán, campo 4 y en el Laboratorio 121 del edificio de Química Orgánica de la FES Cuautitlán campo 1. El segundo procedente del Estado de Hidalgo. Y finalmente el tercer extracto se realizó con un propóleo originario del Toluca.

Medios de cultivo y Reactivos

Se trabajó con Agar Dextrosa Papa (marca DIBICO) y un Agar dextrosa elaborado en el Laboratorio de Microbiología (Laboratorio 6) de la UIM de la FESC a base de pulpa de papa. Se utilizaron antimicóticos impregnados en disco, los cuales fueron: Anfotericina B 100 µg (BIO-RAD), Voriconazol 1 µg (BIO-RAD), Miconazol 50 µg (BIO-RAD) y Ketoconazol 50 µg (BIO-RAD).

1. Métodos para la identificación

Para llevar a cabo la identificación de las cepas a utilizar en este trabajo, se siguió la metodología que se describe a continuación.



2. Prueba de inhibición del crecimiento radial

La prueba de inhibición del crecimiento radial fue elaborada de acuerdo a técnica descrita por Ye, 1999 y modificada por Wang y Bun, 2002.

2.1 Preparación de las cepas.

Se sembró cada una de las cepas a trabajar (*Aspergillus falvus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus* y *Fusarium moniliforme*) en placas de Agar Dextrosa Papa (PDA), dejándolas incubar (Incubadora Felisa Modelo 293) a 24°C por 7 días.

2.2 Elaboración de discos impregnados con EEP

Se cortaron discos de papel Whatman No.5 con un diámetro de 0.5mm, los cuales una vez esterilizados fueron impregnados con extracto etanólico de propóleo a las concentraciones de 1, 5 10, 15 y 25 mg por disco y a manera de control se utilizó etanol al 70%, ya que este fue empleado como diluyente para el propóleo. Para lograr las concentraciones antes mencionadas se realizaron tres soluciones STOCK de EEP, en la primera se disolvieron 4 mg de propóleo en 40 µl de etanol al 70%, en la segunda 60 mg en 120 µl y por último en la tercera 160 mg de propóleo en 160µl de etanol al 70%.

Lo antes mencionado se realizó para cada uno de los propóleos a utilizar (FESC, Toluca e Hidalgo).

2.3 Inoculación de las placas.

Se prepararon placas de PDA con un grosor de 4mm en cajas petri (100 x 15mm), a las cuales en el centro se les inoculó la cepa a trabajar. Dicho inóculo fue obtenido a partir de las cepas anteriormente preparadas, las cuales se perforaron con ayuda de un tubo de vidrio con un diámetro interno de 5mm, esto con el fin de estandarizar el inóculo.

Posteriormente en una de las cajas, a 15mm de distancia del inóculo se colocaron 3 discos impregnados con EEP a las concentraciones de 1, 5 y 10 mg así como un disco control impregnado con etanol al 70%; en otra placa se colocaron de igual forma los discos de 15 y 25 mg de EEP y uno control.

A manera de comparación se utilizaron discos de Anfotericina B 100µg (BIO-RAD), Voriconazol 1µg (BIO-RAD), Miconazol 50µg (BIO-RAD) y Ketoconazol 50µg (BIO-RAD), estos discos se colocaron en otra placa, a las mismas condiciones que los impregnados con EEP.

Materiales y métodos

Finalmente todas las placas se incubaron a 24°C hasta que la superficie del agar quedo cubierta por el micelio y se logró observar las zonas de inhibición, indicadas con la formación de medias lunas, es decir entre los 5 y 7 días según la cepa.

Esto se realizó con cada una de las cepas (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus* y *Fusarium moniliforme*) y cada uno de los propóleos a trabajar (FESC, Hidalgo y Toluca).

3. Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

Se recurrió a la técnica, dilución en placa de 24 pozos descrita por Londoño OA 2010.

3.1 Preparación de las cepas.

Se sembró cada una de las cepas a trabajar (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus* y *Fusarium moniliforme*) en placas de Agar Dextrosa Papa, dejándolas incubar a 24°C por 7 días.

3.2 Preparación de la placa de 24 pozos

Se emplearon placas de 24 pozos con fondo plano (EVERGREEN), donde cada tres pozos correspondían a una concentración expresada en mg/mL, tal como se muestra en la figura 10.

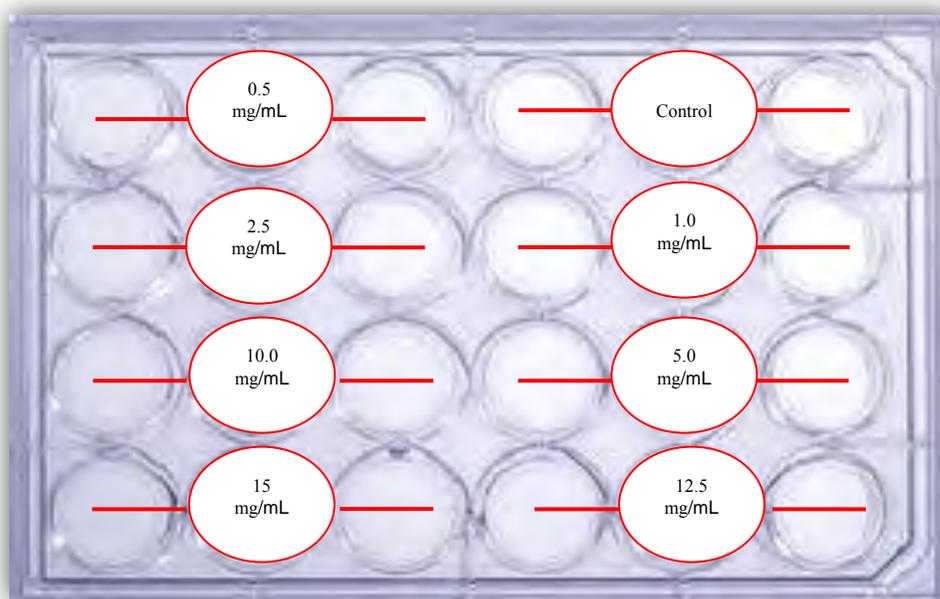


Figura 10 Distribución de las concentraciones del EEP en la placa de 24 pozos.

Materiales y métodos

A cada uno de los pozos se le adicionó un mililitro de PDA, considerando que para obtener las concentraciones antes mencionadas se realizó una solución STOCK a una concentración de 200mg de EEP en 200µl de etanol al 70%.

Se realizó una placa para cada uno de los propóleos, considerando una placa por cada cepa a trabajar.

3.3 Inoculación de la placa de 24 pozos

Una vez temperada nuestra placa, se inoculó en el centro de cada uno de los pozos la cepa la cual fue previamente sembrada con 7 días de antelación. Dicho inóculo se estandarizó con un capilar (LAUKA 07035) de 1.60mm de diámetro interno.

Se incubaron todas las placas a 24°C y al cabo de aproximadamente 4 días, cuando se observó el total desarrollo del hongo en los pozos control, se midieron los diámetros de crecimiento fúngico en todos los pozos de la placa de cultivo con ayuda de un vernier (Scala) escala de 12cm.

4. Análisis estadístico

Se determinó el porcentaje de inhibición para cada una de las cepas expuestas ante cada uno de los tres diferentes propóleos, de acuerdo a los resultados obtenidos en la prueba de dilución en placa de 24 pozos, utilizando la siguiente formula:

$$\% \text{ de Inhibición} = \frac{Dc - Dt}{Dc} \times 100$$

Dónde:

Dc = diámetro del control

Dt = diámetro del tratamiento.

Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente mediante el programa GraphPad Prism 6.

5. Determinación de Aflatoxinas

Se empleó el método fluorométrico Aflatest^R para maíz, sorgo, granos y alimentos balanceados.

4.1 Estandarización del inóculo

Se sembraron las cepas de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus niger* en Agar Dextrosa Papa a 24°C por 7 días. Posterior a esto se realizó una suspensión de conidios con SSF estéril, ajustando esta al tubo 0.5 del Nefelometro de McFarland; se dejó sedimentar por 3 minutos y se transfirió el sobrenadante a un tubo estéril, el cual se homogenizó con ayuda de un vortex (Daigger). De dicha solución se realizó una dilución 1:10, de la cual se tomaron 10µl para llenar la cámara de Neubauer (Marienfeld) y realizar el conteo en los 4 cuadrantes secundarios, a 40x (Microscopio Leica) con el fin de determinar la cantidad de conidios por mililitro contenidos en la suspensión y así poder realizar la dilución pertinente que nos lleve a tener una solución final con una concentración de 1×10^5 conidios/mL.

4.2 Preparación de la muestra

Se prepararon 16 cajas petri (100 x 15 mm) con 20 mL de PDA por cepa a trabajar, de las cuales 8 contenían propóleo de la FESC a una concentración de 15 mg/mL; para lograr esta concentración por caja, se realizó una solución STOCK a una concentración de 7g de propóleo en 7mL de etanol al 70%.

Una vez que realizamos nuestras placas, cada una fue inoculada con 1mL de la solución estandarizada de acuerdo a la cepa correspondiente, posteriormente se incubaron a 24°C por periodos de 2, 4, 6 y 8 días de crecimiento. Es importante mencionar que las cajas que contenían solo PDA se utilizaron como control.

4.3 Procesamiento de la muestra para la extracción de Aflatoxinas.

La extracción de Aflatoxinas se realizó de acuerdo al método descrito por Vicam.

6. Determinación de Fumonisinias.

Se empleó el método fluorométrico FumonitestTM para maíz, sorgo y alimentos para aves con 17% de proteínas.

6.1 Estandarización del inóculo

Se sembraron las cepas de *Fusarium moniliforme* en Agar Dextrosa Papa a 24°C por 7 días. Posterior a esto se realizó una suspensión de conidios con SSF estéril, ajustando esta al tubo 0.5 del Nefelometro

Materiales y métodos

de McFarland; se dejó sedimentar por 3 minutos y se transfirió el sobrenadante a un tubo estéril, el cual se homogenizó con ayuda de un vortex (Dargger). De dicha solución se realizó una dilución 1:10, de la cual se tomaron 10 µl para llenar la cámara de Neubauer (MArienfeld) y realizar el conteo en los 4 cuadrantes secundarios a 40x (Microscopio Leica), con el fin de determinar la cantidad de conidios por mililitro contenidos en la suspensión y así poder realizar la dilución pertinente que nos llevase a tener una solución final con una concentración de 1×10^5 conidios/mL.

6.2 Preparación de la muestra

Se prepararon 16 cajas petri (100 x 15 mm) con 20 mL de PDA, de las cuales 8 contenían propóleo de la FESC a una concentración de 15 mg/mL; para lograr esta concentración por caja, se realizó una solución STOCK a una concentración de 7 mg de propóleo en 7 mL de etanol al 70%.

Una vez que realizamos nuestras placas, cada una fue inoculada con 1 mL de la solución estandarizada de *Fusarium moniliforme*., posteriormente se incubaron a 24°C por periodos de 2, 4, 6 y 8 días de crecimiento. Es importante mencionar que las cajas que contenían solo PDA se utilizaron como control.

6.3 Procesamiento de la muestra para la extracción de Fumonisinias.

La extracción de Fumonisinias se realizó de acuerdo al método descrito por Vicam.

VII. RESULTADOS

Identificación de los hongos

- Identificación de *Aspergillus flavus*.

Al cabo de aproximadamente 6 días de crecimiento en PDA observamos en el anverso de la colonia un crecimiento abundante de aspecto polvoroso con una coloración verde-amarillo, sin producción de pigmentos al reverso. La técnica de micocultivo, nos permitió observar al microscopio (Figura 11) que dicha cepa se trataba de un hongo hialino con microconidios redondos equinulados, presentando estructuras llamadas cabezas aspergilaras compuestas por conidióforos largos y una vesícula redonda de donde nacen dos series de fialides en un ángulo de aproximadamente 360°.

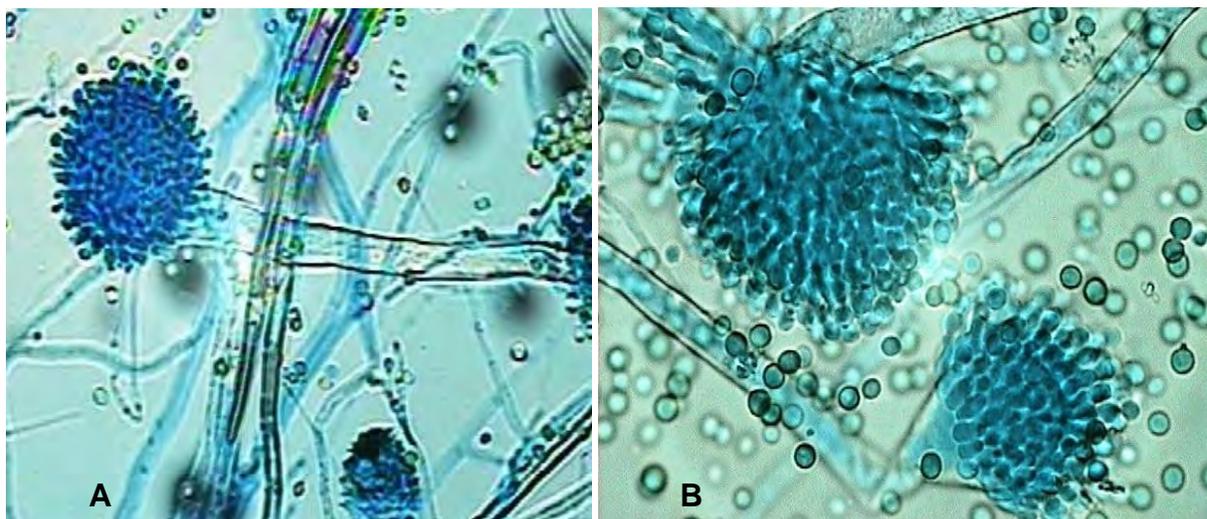


Figura 11. Morfología microscópica de *Aspergillus flavus* con la tinción Azul de algodón. A: 40x. B: 100x. Imágenes tomadas en el Laboratorio 6 de Microbiología de la UIM de FES Cuautitlán UNAM.

- Identificación de *Aspergillus niger*.

Después de 7 días de incubación en PDA observamos un abundante crecimiento con una coloración inicial blanca amarilla para finalmente presentar un color negro, de aspecto polvoroso sin producción de pigmentos al reverso. Al microscopio se identificó un hongo hialino con microconidos redondos, cabezas aspergilaras compuestas por conidióforos largos y vesículas redondas más grandes que las mostradas por *Aspergillus flavus*, con dos series de fialides en un ángulo de 360°, siendo la primeras más grande que las segundas, lo cual se puede apreciar en la siguiente figura.

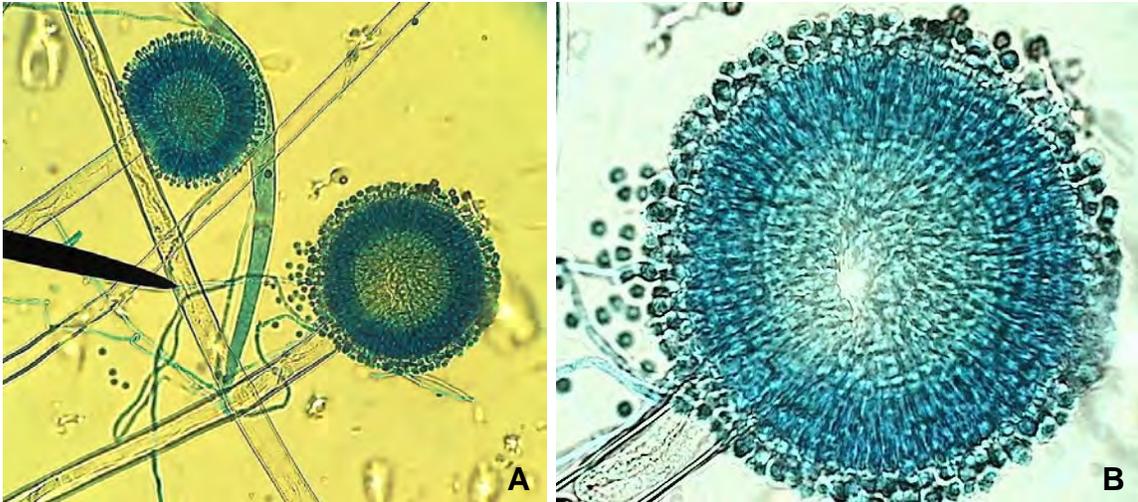


Figura 12. Morfología microscópica de *Aspergillus niger* con la tinción Azul de algodón. A: 40x. B: 100x. Imágenes tomadas en el Laboratorio 6 de Microbiología de la UIM de FES Cuautitlán UNAM.

➤ Identificación de *Aspergillus ochraceus*

El crecimiento del hongo en PDA fue abundante pero no uniforme de aspecto polvoroso, con una coloración amarilla-verde sin producción de pigmentos al reverso de la colonia. El micocultivo nos permitió ver al microscopio que se trataba de un hongo hialino con microconidios redondos, cabezas aspergilaras conformadas por un conidióforo largo y una vesícula globosa aparentemente más pequeña que la de *Aspergillus niger* pero más grande que la de *Aspergillus flavus*, de ella nacen dos series de fialides la primera ligeramente más grande que la segunda Figura 13.

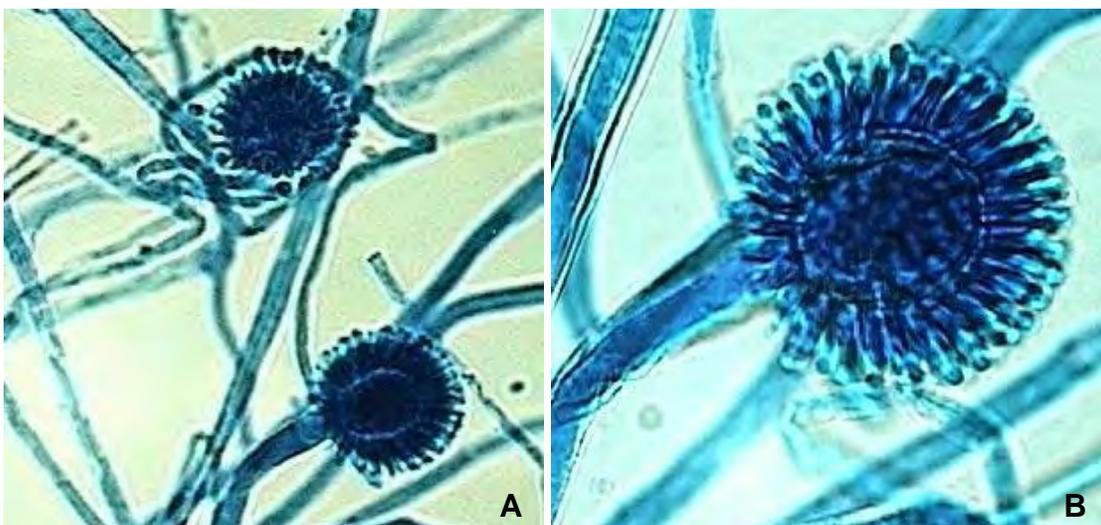


Figura 13. Morfología microscópica de *Aspergillus ochraceus* con la tinción Azul de algodón. A: 40x. B: 100x. Imágenes tomadas en el Laboratorio 6 de Microbiología de la UIM de FES Cuautitlán UNAM.

Resultados

➤ Identificación de *Fusarium moniliforme*

En PDA se observó una colonia abundante de aspecto vellosa o algodonosa, la cual abarcó todo el medio, presentando un color inicial blanquecino y finalizando con un lila-purpura, en el reverso se evidenció la producción de un pigmento violeta difusible en el medio. Al microscopio observamos un hongo hialino septado con hifas organizadas de manera coremium, de igual forma se percibieron microconidios fusiformes agrupados en cadenas y conidióforos delgados, tal como se muestra en la siguiente figura.



Figura 14. Morfología microscópica de *Fusarium moniliforme* con la tinción Azul de algodón. A: 40x. B: 100x. Imágenes tomadas en el Laboratorio 6 de Microbiología de la UIM de FES Cuautitlán UNAM.

Efecto de los diferentes propóleos, sobre el crecimiento de los géneros *Aspergillus* y *Fusarium*.

Prueba de inhibición del crecimiento radial

Se realizó un control negativo para cada uno de los hongos, siendo este el mismo para los diferentes propóleos en la prueba de inhibición del crecimiento radial, de igual forma se montó una placa con variados antimicóticos a manera de comparación, para cada uno de los hongos, el cual se utilizó para los tres propóleos.

Resultados

Los tres propóleos presentaron actividad antimicótica, sin embargo el máximo efecto se observó en el uso del propóleo originario de FESC contra la cepa de *Fusarium moniliforme*, tal como se percibe en la Tabla 7 y se evidencia con las figuras que a continuación se muestran.

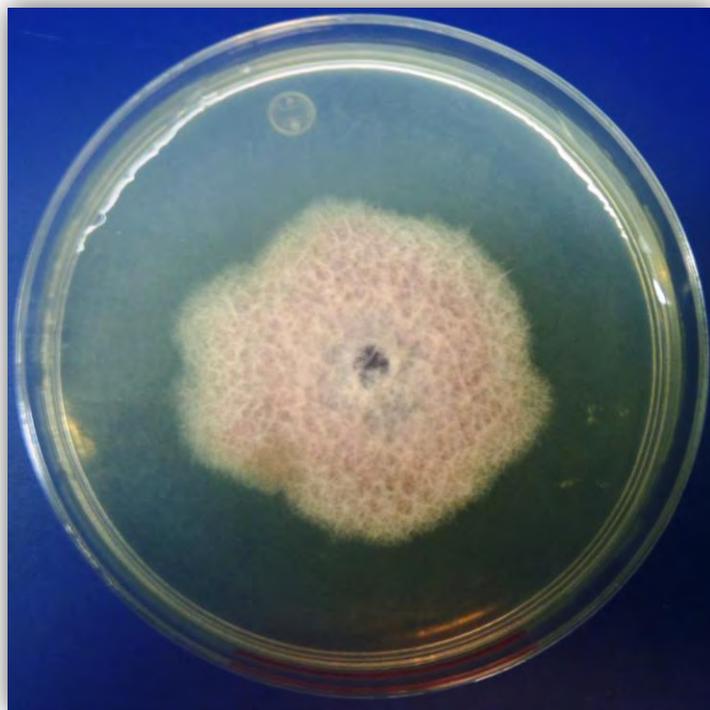


Figura 15. Control negativo de *Fusarium moniliforme*, crecimiento del hongo sin presencia de algún tratamiento.

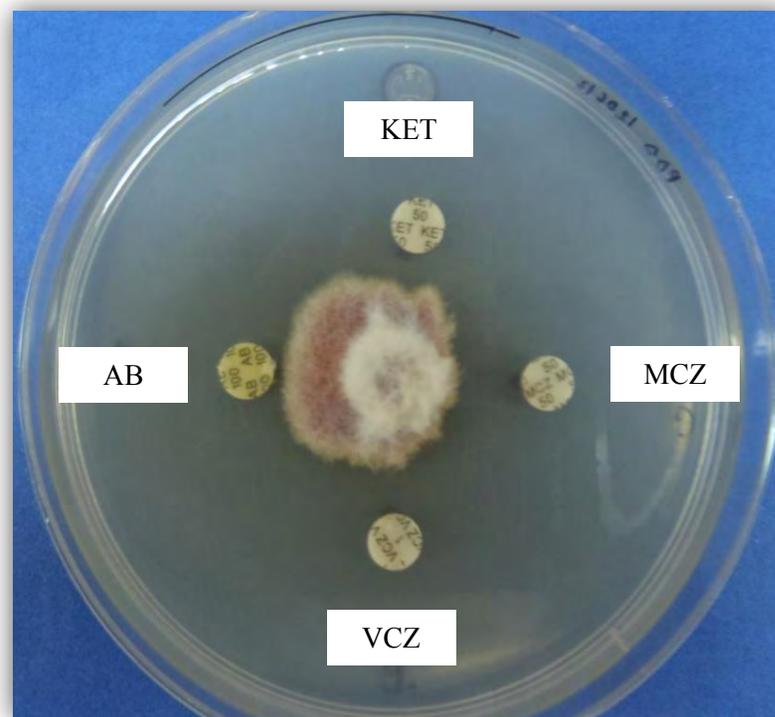


Figura 16. Inhibición del crecimiento radial de *Fusarium moniliforme* utilizando discos de Antimicóticos comerciales. Presentando una importante disminución del desarrollo fúngico.

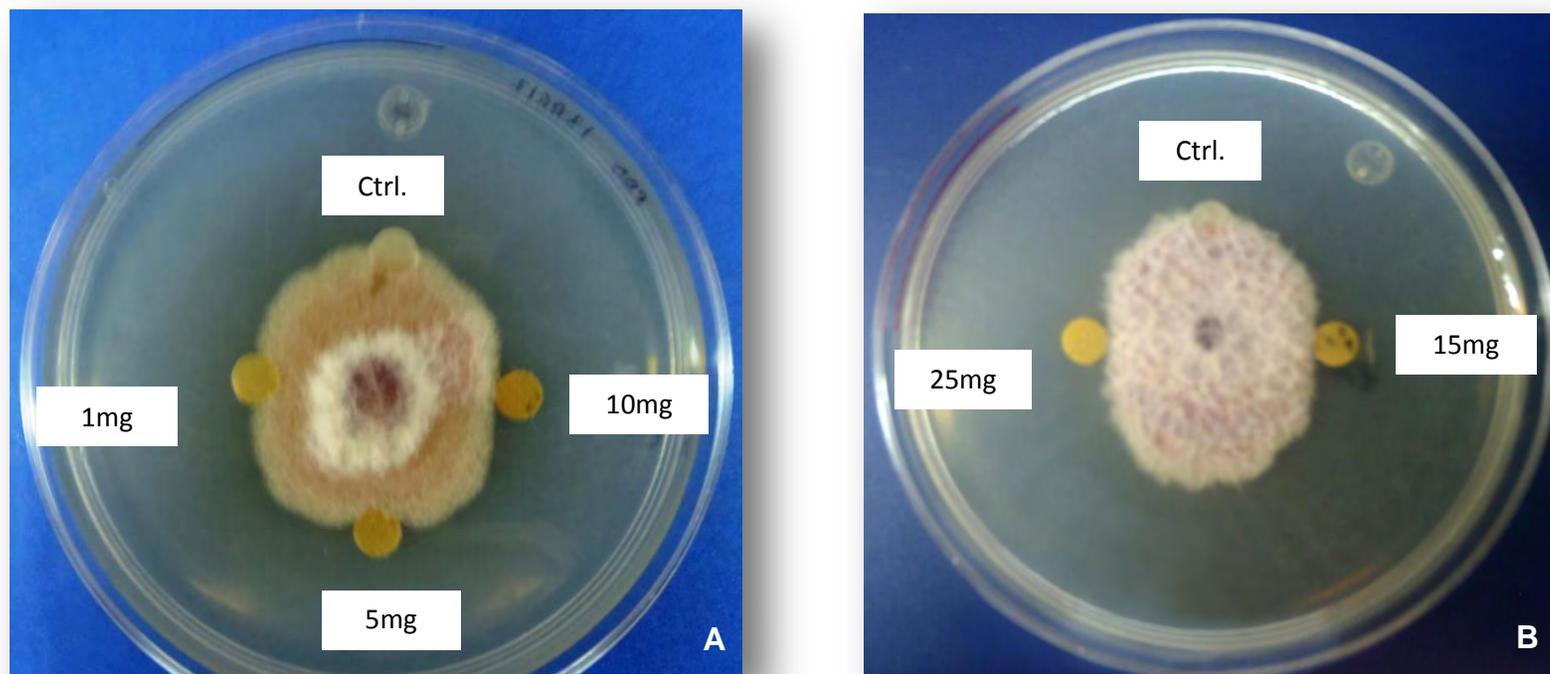


Figura 17. Inhibición del crecimiento radial de *Fusarium moniliforme* utilizando discos impregnados con EEP oriundo de la FESC UNAM. Se observa la ligera formación de medias lunas a las concentraciones de 1 y 5 mg (A), sin embargo en los discos de 15 y 25 mg a pesar de que este fenómeno no se presenta el crecimiento fúngico es mayor en dirección y sobre el disco control (B).

Tabla 7. Lectura de la prueba de inhibición del crecimiento radial utilizando EEP proveniente de FESC, Hidalgo y Toluca, sobre los géneros *Aspergillus* y *Fusarium*.

Hongo	Ctrl. Negativo	Ctrl. Etanol	Propóleo FESC					Propóleo Hidalgo					Propóleo Toluca				
			1mg	5mg	10mg	15mg	25mg	1mg	5mg	10mg	15mg	25mg	1mg	5mg	10mg	15mg	25mg
<i>Aspergillus flavus</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-
<i>Aspergillus niger</i>	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+
<i>Aspergillus ochraceus</i>	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+
<i>Fusarium moniliforme</i>	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+

La inhibición se denota con el signo de +, por lado contrario el signo de – nos indica que no hubo inhibición.

Prueba de dilución en placa de 24 pozos

Mediante esta prueba pudimos evidenciar cuantitativamente la propiedad antimicótica que posee el propóleo, no obstante al igual que en la prueba de difusión radial, el mayor efecto se observó al utilizar el EEP oriundo de FESC frente a *Fusarium moniliforme*, tal como se aprecia en la siguiente figura.

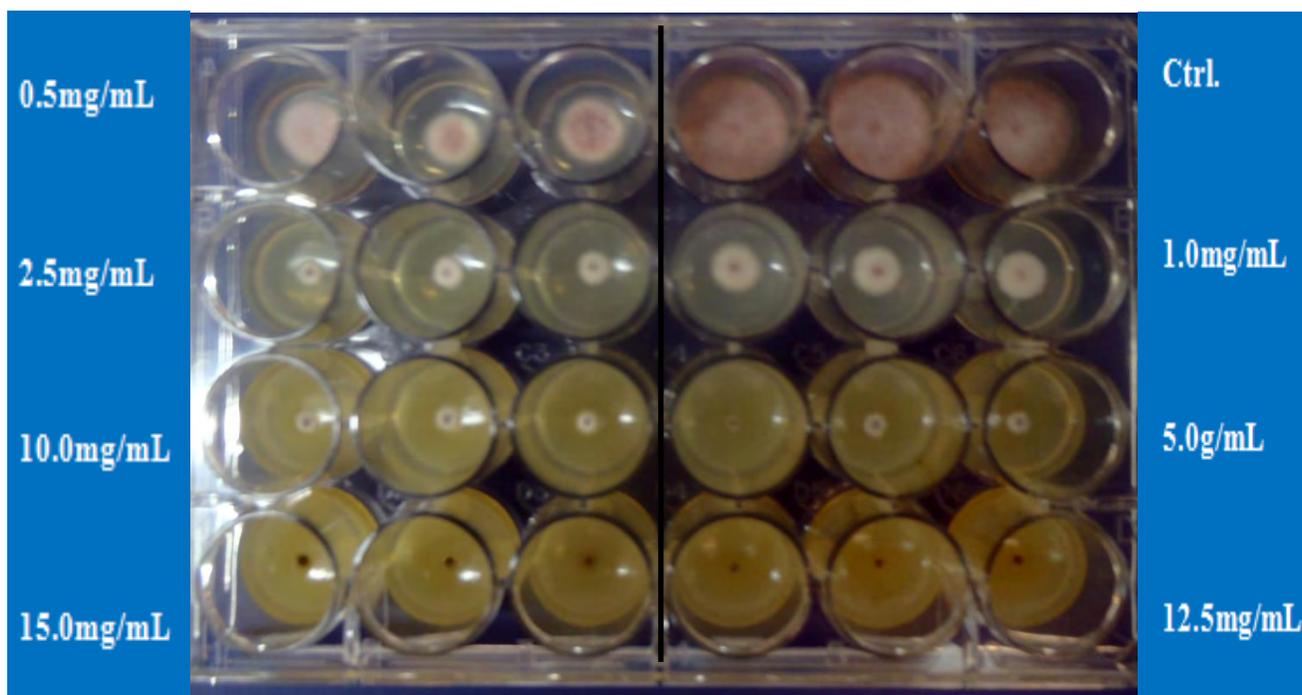


Figura 18. Determinación de la concentración mínima inhibitoria del EEP procedente de FESC UNAM, para *Fusarium moniliforme*. Se observa el total desarrollo del hongo en los pozos control y una importante disminución del crecimiento conforme aumenta las concentraciones de EEP. Sin embargo en los 3 pozos a las concentraciones de 12.5 y 15 mg se presentó inhibición.

A continuación se muestran los datos obtenidos en las placas de 24 pozos para cada hongo frente a cada uno de los propóleo empleados a diferentes concentraciones.

Tabla 8. Porcentaje de inhibición del crecimiento de los géneros, *Aspergillus* y *Fusarium*, utilizando EEP proveniente de FESC UNAM.

Concentración de EEP (mg/mL)	Especies fúngicas			
	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus ochraceus</i>	<i>Fusarium moniliforme</i>
CONTROL	0	0	0	0
0.5	22.7	11.4	18	40
1.0	33.4	22.7	26.7	62.7
2.5	40	33.4	33.4	78
5	46.7	42.7	36	89.4
10	51.4	49.4	44.7	96
12.5	53.4	51.4	46.7	100
15	53.4	64.7	51.4	100

Tabla 9. Porcentaje de inhibición del crecimiento de los géneros, *Aspergillus* y *Fusarium*, utilizando EEP proveniente de Hidalgo.

Concentración de EEP (mg/mL)	Especies fúngicas			
	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus ochraceus</i>	<i>Fusarium moniliforme</i>
CONTROL	0	0	0	0
0.5	11	0	0	2.7
1.0	20.6	0	11.4	6.7
2.5	17.9	0	18	22.7
5	24.7	0	23.4	29.4
10	23.7	0	33.4	40
12.5	31.6	2.7	33.4	49.4
15	34.3	9.4	36	49.4

Resultados

Tabla 10. Porcentaje de inhibición del crecimiento de los géneros, *Aspergillus* y *Fusarium*, utilizando EEP proveniente de Toluca.

Concentración de EEP (mg/mL)	Especies fungicas			
	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus ochraceus</i>	<i>Fusarium moniliforme</i>
CONTROL	0	0	0	0
0.5	17.9	0	0	0
1.0	24.7	0	0	2.7
2.5	24.7	0	6.7	22.7
5	27.4	0	11.4	29.4
10	38.4	0	29.4	42.7
12.5	38.4	2.7	33.4	46.7
15	38.4	9.4	33.4	58

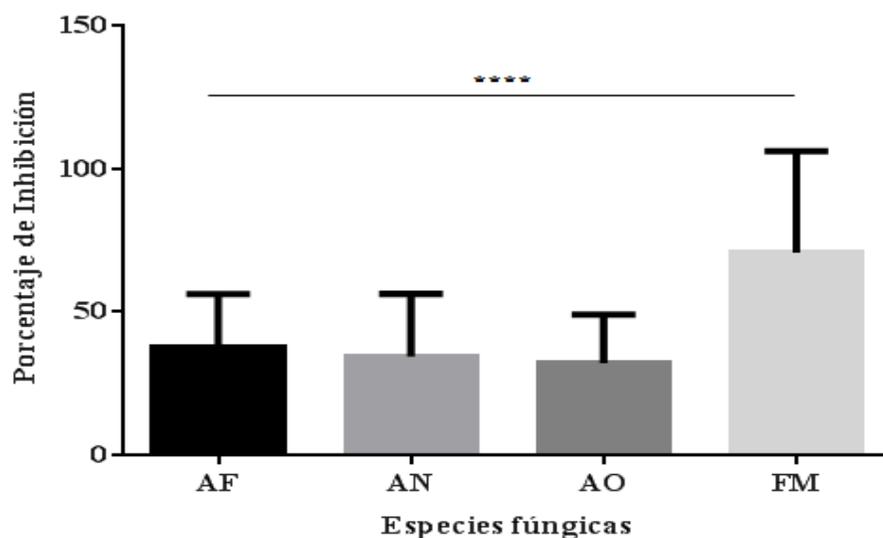


Gráfico 1. Comparación de la desviación estándar que presentó la actividad del propóleo de la FESC sobre *Aspergillus flavus* (AF.), *Aspergillus niger* (AN), *Aspergillus ochraceus* (AO) y *Fusarium moniliforme* (FM). Mostrando diferencia significativa entre las especies estudiadas, **** ($p < 0.0008$).

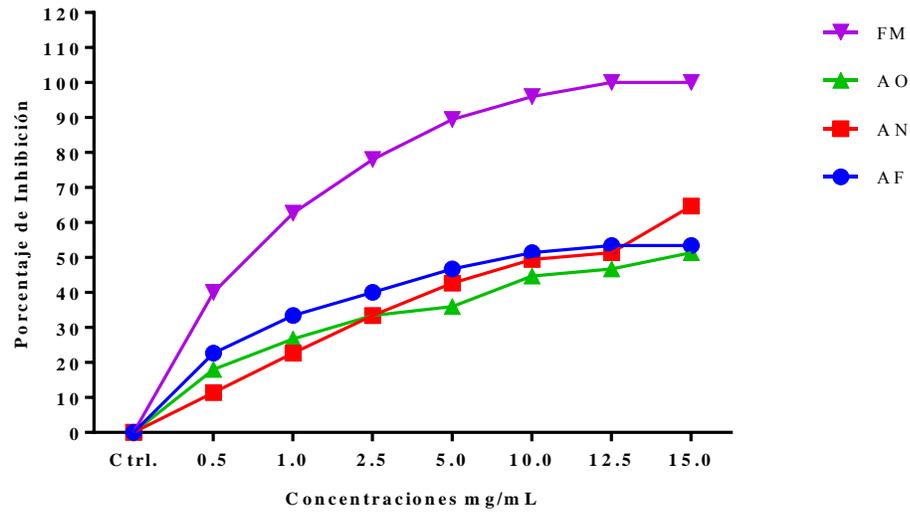


Gráfico 2. Comparación de la actividad del propóleo originario de FESC a diferentes concentraciones, sobre cada una de las especies fúngicas. Mostrando en todas las cepas una disminución significativa en su desarrollo conforme aumentan las concentraciones.

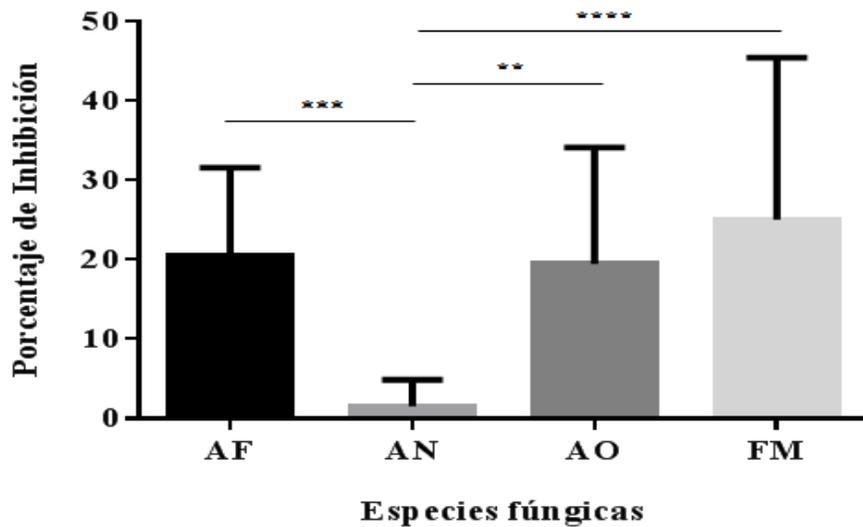


Gráfico 3. Comparación de la desviación estándar que presentó la actividad del propóleo de Hidalgo sobre *Aspergillus flavus* (AF.), *Aspergillus niger* (AN), *Aspergillus ochraceus* (AO) y *Fusarium moniliforme* (FM). Mostrando diferencia significativa entre las especies estudiadas, **** (p= 0.0008), *** (p=0.0007), ** (p=0.006).

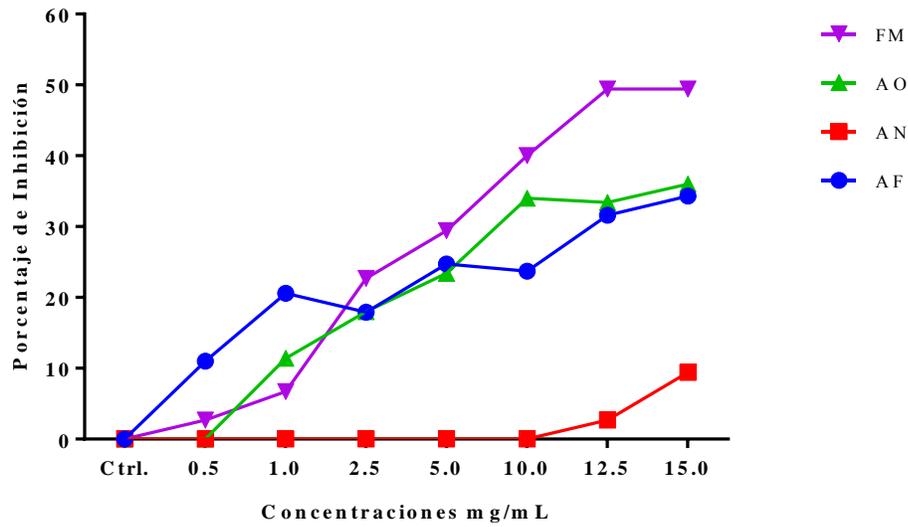


Gráfico 4. Comparación de la actividad del propóleo originario de Hidalgo a diferentes concentraciones, sobre cada una de las especies fúngicas. Donde *Fusarium moniliforme* fue la especie que mostro una disminución significativa en su desarrollo conforme aumentan las concentraciones.

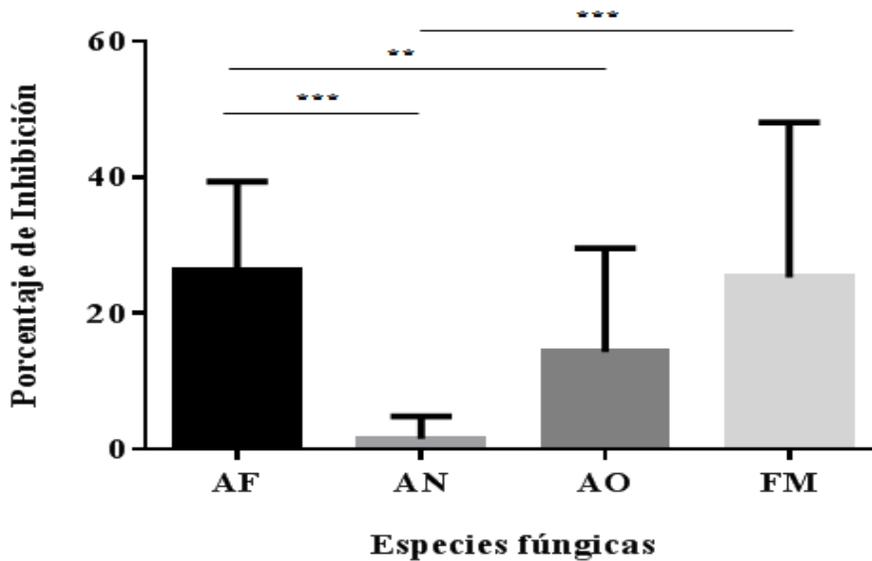


Gráfico 5. Comparación de la desviación estándar que presentó la actividad del propóleo de la Toluca sobre *Aspergillus flavus* (AF.), *Aspergillus niger* (AN), *Aspergillus ochraceus* (AO) y *Fusarium moniliforme* (FM). Mostrando diferencia significativa entre las especies estudiadas, *** ($p < 0.0006$), ** ($p < 0.0052$).

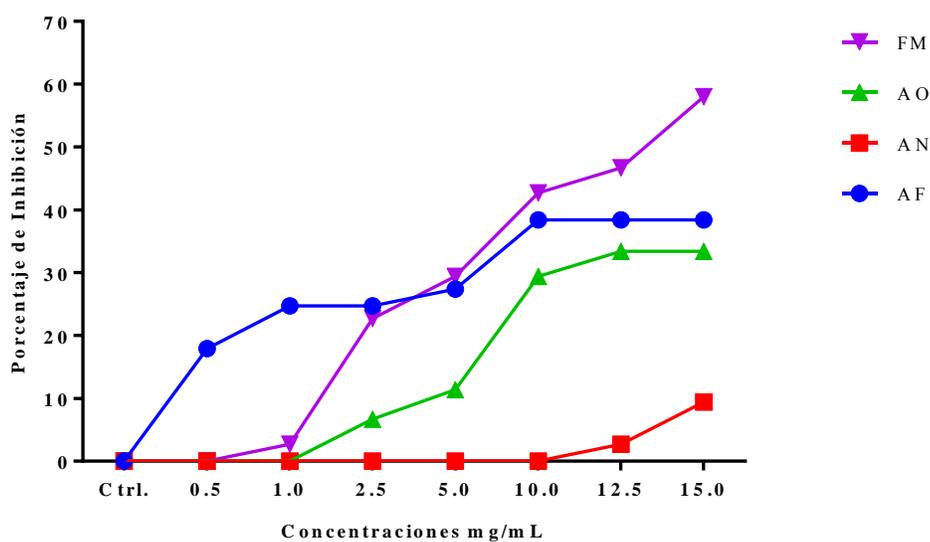


Gráfico 6. Comparación de la actividad del propóleo originario de Toluca a diferentes concentraciones, sobre cada una de las especies fúngicas. Donde *Fusarium moniliforme* fue la especie que mostrando una disminución significativa en su desarrollo conforme aumentan las concentraciones.

Extracción de Micotoxinas

Aspergillus flavus y *Aspergillus niger* no presentaron sensibilidad ante el propóleo de FESC ya que en las placas de PDA con EEP oriundo de FESC hubo un desarrollo fúngico similar al crecimiento en las placas control, es decir sin tratamiento, sin embargo en el caso de *Fusarium moniliforme*, este solo se desarrolló en las placas control, tal como se muestra en la siguiente figura.

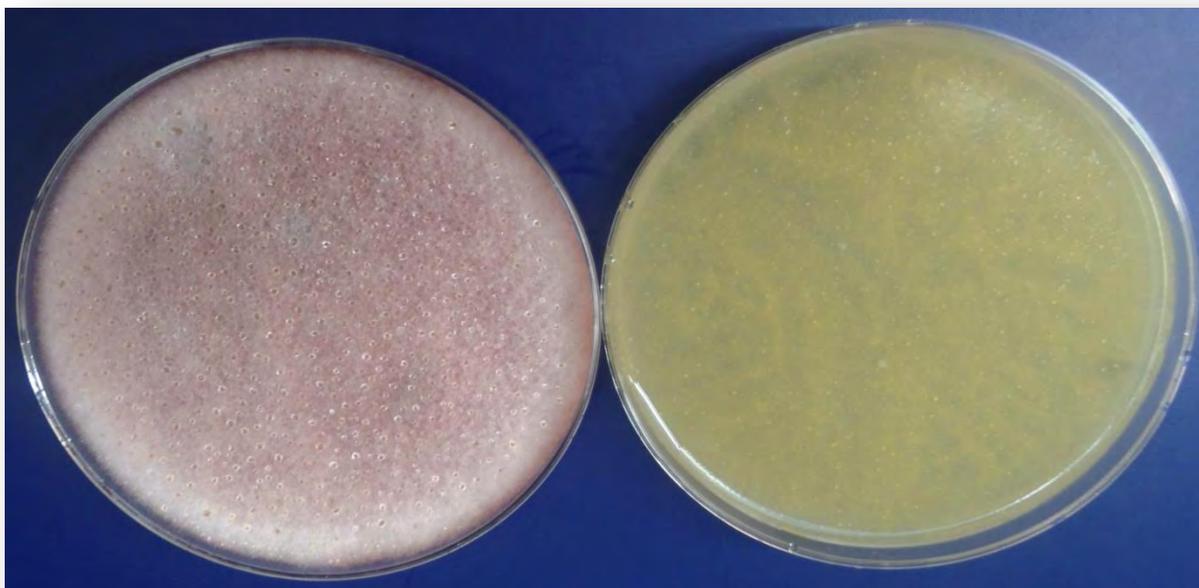


Figura 19. Inhibición del crecimiento de *Fusarium moniliforme* mediante la utilización de propóleo. Izq. Placa de PDA (Control negativo). Dcha. Placa de PDA con EEP procedente de FESC a una concentración de 15mg/mL. El desarrollo fúngico solo se presentó en la placa control.

Tabla 11. Lectura de la prueba de extracción de micotoxinas, utilizando EEP proveniente de FES Cuautitlán UNAM.

Genero y Especie	Micotoxina	Ctrl.	2días	4días	6días	8días
<i>Aspergillus niger</i>	Aflatoxina	4ppb	0ppb	0ppb	0ppb	0ppb
		0ppb	0ppb	0ppb	4ppb	4ppb
<i>Aspergillus flavus</i>	Aflatoxina	0ppb	4ppb	0ppb	0ppb	0ppb
		4ppb	0ppb	0ppb	4ppb	0ppb
<i>Fusarium moniliforme</i>	Fumonisinias	27ppb	0ppb	0ppb	0ppb	0ppb
		13.2ppb	0ppb	0ppb	0ppb	0ppb

ppb: indica partes por billón.

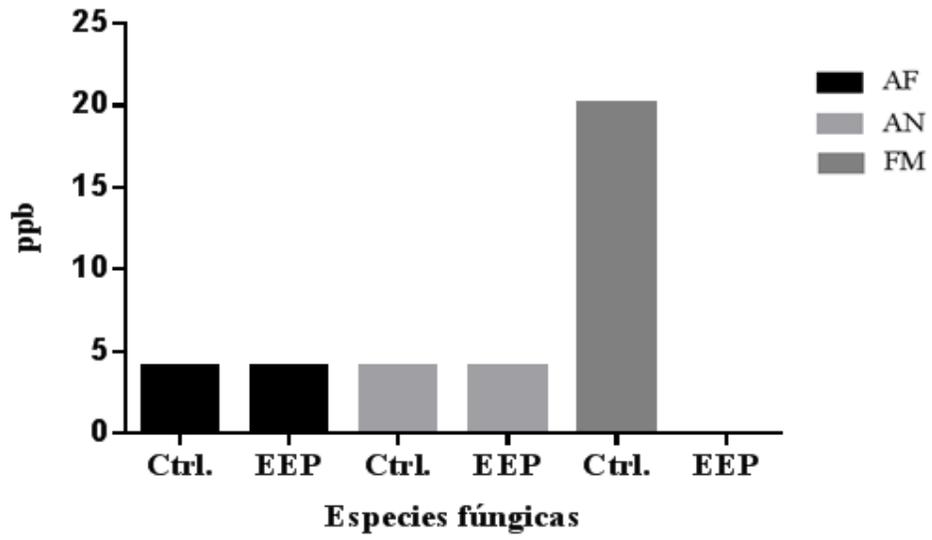


Gráfico 7. Concentración de micotoxinas que presentó cada hongo: AF, AN y FM en placas con EEP oriundo de FESC así como placas control (Ctrl.). Mostrando diferencia significativa entre el control y tratamiento solo para *Fusarium moniliforme*.

VIII. DISCUSIÓN

Los tres propóleos presentaron diferencias entre sí en cuanto a la inhibición del crecimiento radial de los distintos géneros, sin embargo las 3 especies de *Aspergillus* mostraron un comportamiento de inhibición similar entre ellas frente a los propóleos de Toluca e Hidalgo. El propóleo proveniente de FESC demostró actividad para las cuatro especies fúngicas, para el caso de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus* y *Fusarium moniliforme*, esta se presentó a partir de 5 mg/mL y en el caso de *Aspergillus niger* fue desde 10 mg/mL Tabla 7. *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus* y *Fusarium moniliforme* igualmente presentaron inhibición ante el propóleo de hidalgo a partir de una concentración de 1mg/mL, por su parte *Fusarium moniliforme* evidenció además la formación de medias lunas y ausencia de micelio aéreo alrededor de los discos. Respecto a *Aspergillus niger*, este mostró sensibilidad desde 5 mg/mL Tabla 7. Finalmente el propóleo oriundo de Toluca, aunque si presento actividad, esta fue menor y solo en las especies de *Aspergillus niger*, *Aspergillus ochraceus* y *Fusarium moniliforme* Tabla 7. Cabe mencionar que referente al género de *Aspergillus*, al no controlarse bien el crecimiento radial en dicha prueba debido a la dificultad del manipuleo de la cepa para que solo creciera en el centro de la caja, se recurrió al uso de la técnica de dilución en placa de 24 pozos. Aun cuando los diferentes propóleos mostraron actividad ante los dos géneros, la sensibilidad fue diferente para cada especie fúngica, lo cual es dependiente de la concentración y el origen del propóleo.

Es importante señalar que los resultados antes mencionados se compararon con el control negativo para cada uno de los hongos, es decir su crecimiento radial sobre PDA sin la presencia de algún tratamiento, así como su desarrollo ante un control de etanol al 70% / tween 80, el cual fue utilizado como disolvente de los propóleos utilizados en este trabajo; en todos los casos se observó el crecimiento fúngico sobre estos discos, evidenciando así que dicho dispersante no afecta la actividad del propóleo ni el desarrollo del hongo, coincidiendo con lo propuesto por Martínez en el 2009, el cual considero la mezcla tween 80/ etanol la más apropiada para dispersar un EEP en medio PDA ya que dicha mezcla y sus componentes por separado presentan un porcentaje de inhibición homogéneo e inferior al 5% (Martínez 2009). A manera de comparación se probó la sensibilidad de los diferentes hongos ante algunos antifúngicos utilizados en la terapia contra estos hongos. Entre las opciones terapéuticas la utilización de azoles debe tener en cuenta factores relacionados con la especie del hongo y aspectos farmacocinéticos, la combinación de opciones terapéuticas en el tratamiento es incierto y justifica la realización de un ensayo clínico controlado prospectivo. Los más empleados son Voriconazol y

Anfotericina B. Voriconazol es un triazol fungistático (Bonifaz, 2012) de buena absorción (Franco, 2006) y por su lado Anfotericina B se trata de un compuesto aislado de *Streptomyces nodosus* con un 95% de unión a proteínas plasmáticas y la capacidad de entrar a líquido cefalorraquídeo (Franco, 2006). Sin embargo a pesar de las variadas e importantes reacciones adversas que presentan estos fármacos (Anexo 4) son considerados la primera alternativa para el tratamiento de las micosis sistémicas patógenas oportunistas, como es el caso de la Aspergilosis y Fusariosis. Ketoconazol es un imidazol usado en algunas variantes clínicas ya que presenta una errática absorción (López, 2012) y finalmente Miconazol, el cual es un derivado azólico, es útil para patologías que requieren terapia tópica (Franco, 2006). *Aspergillus flavus* presentó mayor sensibilidad a miconazol seguido de ketoconazol, voriconazol y finalmente anfotericina B. *Aspergillus niger* y *ochraceus* presentaron sensibilidad principalmente a voriconazol, seguido de miconazol, anfotericina B y finalmente ketoconazol. Respecto a *Fusarium moniliforme*, este mostró inhibición ante miconazol, posteriormente voriconazol, ketoconazol y por último anfotericina B Figura 16.

De acuerdo a la sensibilidad que los dos géneros presentaron ante los diferentes propóleos y comparando con la registrada por los antifúngicos, podemos ver que la concentración empleada por los fármacos para alcanzar un efecto inhibitorio, es mucho menor que la manejada en los EEP. Sin embargo es aquí donde podemos considerar que no se han registrado efectos secundarios o reacciones alérgicas importantes por parte de los propóleos, caso contrario a los antifúngicos, los cuales al ser tóxicos tienden a desarrollar una gran variedad de efectos colaterales.

La prueba de inhibición del crecimiento radial es considerada una prueba cualitativa, por lo tanto solo nos ayudó a determinar las concentraciones a utilizar en la placa de 24 pozos, habiendo encontrado sensibilidad por parte de los hongos entre las concentraciones de 5 a 25 mg/mL, se decidió trabajar con las concentraciones de 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 12.5 y 15 mg/mL en la prueba de dilución en placa de 24 pozos. En dicha prueba pudimos corroborar la propiedad antimicótica del propóleo de la FESC ante los diferentes géneros Tabla 8. *Aspergillus flavus* presentó una inhibición de 51.4% a una concentración de 10 mg/mL de EEP, por su parte *Aspergillus niger* a 12.5 mg/mL de EEP se inhibió un 51.4%, finalmente *Aspergillus ochraceus* mostró un 46.7% de inhibición a una concentración de 12.5 mg/mL de EEP. Respecto a *Fusarium moniliforme*, el propóleo de la FESC evidenció la propiedad que tiene para inhibir el hongo un 96% a una concentración de 10 mg/mL Figura 18. Por su parte los propóleos oriundos de Toluca e Hidalgo presentaron una actividad muy similar entre los diferentes hongos. La cual no fue significativa ante *Aspergillus niger*, puesto que su mayor inhibición se encontró por debajo del 9% a una concentración de 15 mg/mL. El propóleo de Hidalgo ante *Aspergillus flavus* utilizando

una concentración de 15 mg/mL se inhibió un 34% y ante *Aspergillus ochraceus* varió a un 36%, sin embargo *Fusarium moniliforme* alcanzó un 49.4% de inhibición a la misma concentración Tabla 9. Finalmente el propóleo de Toluca ante *Aspergillus flavus* a una concentración de 12.5 mg/mL se inhibió un 38% y *Aspergillus ochraceus* un 33%, siendo más sensible *Fusarium moniliforme* al inhibirse un 58% a una concentración de 15 mg/mL Tabla 10. Esta discrepancia en la actividad ante los dos géneros, puede depender del origen y por tanto de la composición química de los propóleos, como ya lo han venido mencionando varios autores, como Gonzales y Bernal en 1997, Martínez en 2009, Gutiérrez en 2011, entre otros.

De acuerdo al análisis estadístico podemos determinar y corroborar que dentro de los propóleos analizados, el originario de FESC fue el que presentó mayor actividad antimicótica ante los dos géneros trabajados, alcanzado un porcentaje de inhibición mayor a 46% para el género de *Aspergillus* y mayor a 96% para el género de *Fusarium* a concentraciones de entre 12.5 mg/mL. Los resultados obtenidos a pesar de no coincidir numéricamente con los reportados por otros investigadores, si coinciden respecto a la propiedad antimicótica que se le confiere al propóleo. Martínez en el 2009 demostró una inhibición del 25% a una concentración de 5mg/mL para el género de *Aspergillus*, García *et. al.*, 2010 utilizó el propóleo a 1mg/mL contra el mismo género y presentó una porcentaje de inhibición de 20 - 30%, Londoño *et. al.*, 2008 encontró actividad contra este género a una concentración de 0.256 mg/mL. Por su parte Aceves *et. al.*, 2008 logró demostrar una inhibición del 75% utilizando propóleo de Jalisco a 100 mg/mL ante el género de *Fusarium* igualmente Özcan, 1999 al utilizar propóleo de Kenya a una concentración de 4% demostró una inhibición mayor a 50% de *Fusarium*. La variabilidad que se presentan en estos resultados se debe al origen de los propóleos utilizados.

Es importante señalar que el género que presentó mayor sensibilidad ante los diferentes propóleos fue *Fusarium* arrojando una diferencia significativa de $p \leq 0.0008$ trabajando con EEP de FESC e Hidalgo y en el caso de Toluca fue de $p < 0.0006$. Este resultado coincide con lo reportado por Rojas en 1998 quien al evaluar distintos extractos alcohólicos de propóleos sobre 20 cepas de hongos filamentosos de los géneros de *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Cunninghamella*, *Fusarium*, *Mucor*, *Penicillium*, entre otros, evidencio que las cepas más sensibles eran *Cunninghamella* y *Mucor*, y las más resistentes *Aspergillus*, *Cladosporium* y *Penicillium*.

Es por los resultados anteriores que se decidió trabajar con el propóleo de FESC a una concentración de 15 mg/mL, para determinar si esté inhibía la producción de micotoxinas, Aflatoxinas en *Aspergillus*

flavus y *niger*, así como Fumonisinias en *Fusarium moniliforme*. Ya que Ghaly *et. al.*, 1998 demostró la reducción de la producción de Aflatoxina B₁ producida por *Aspergillus flavus* en un 34 a 100% utilizando EEP a 1 - 4 g/L, igualmente Khezri *et. al.*, 2006 demostró actividad por parte del propóleo contra las Aflatoxinas. Observando para *Aspergillus flavus* y *Aspergillus niger* un desarrollo fúngico lento a comparación del control a los 2 y 4 días, obteniendo 4 ppb de Aflatoxinas tanto en el control como a los 2, 6 y 8 días Tabla 11, lo cual no nos ayuda a saber concretamente si el propóleo tiene actividad contra las Aflatoxinas, estos resultados tan discrepantes se pudieron deber a la falta de control de las variantes en la producción de estos metabolitos tóxicos, ya que Moreno en 1998 menciona que no siempre las condiciones que permiten tener un crecimiento vegetativo son las condiciones que se requieren para la producción de micotoxinas, pues estos productos del metabolismo secundario de los hongos se generan bajo condiciones más específicas que las requeridas para el crecimiento vegetativo donde al parecer la temperatura es el factor más importante en la inducción de la producción de micotoxinas seguido del sustrato. En la naturaleza se presenta alternancia de temperaturas, lo cual cambia el metabolismo de crecimiento por un metabolismo de subsistencia, dando como consecuencia la producción de metabolitos tóxicos secretados al sustrato, también menciona que en el laboratorio normalmente se utiliza arroz para la producción de altos rendimientos de Aflatoxinas controlando temperatura y humedad.

Para el caso de *Fusarium moniliforme* se extrajeron 20 ppb de Fumonisinias en el control, y en el caso de las placas que contenían EEP a 15 mg/mL no se realizó la cuantificación Tabla 11 dado que ni una presentó crecimiento fúngico Figura 19.

IX. CONCLUSIONES

De acuerdo a los objetivos planteados al inicio de este trabajo y en base a los resultados obtenidos se puede concluir:

1. La actividad antifúngica de los EEP fue dependiente del origen de los propóleos y la concentración del extracto.
2. Se logró determinar de forma cualitativa el efecto antifúngico de los propóleos originarios de FESC, Toluca e Hidalgo sobre las tres especies del género de *Aspergillus* y *Fusarium moniliforme*, mediante la prueba de crecimiento radial.
3. Se determinó que el propóleo que presentó mayor actividad ante los géneros de *Aspergillus* y *Fusarium*, fue el originario de FESC.
4. Los EEP presentaron menor actividad antifúngica ante *Aspergillus niger*, al tener el porcentaje más bajo de inhibición, caso contrario a *Fusarium moniliforme* la cual obtuvo los porcentajes más altos de inhibición ante los tres propóleos estudiados.
5. No se logró determinar la concentración exacta mínima inhibitoria de cada propóleo para el género de *Aspergillus*, dado que no se observó inhibición del crecimiento de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* y *Aspergillus ochraceus*.
6. Se obtuvo la CMI del propóleo de FESC sobre *Fusarium moniliforme*, la cual es de 12.5 mg/mL.
7. Los resultados sobre la eficacia del propóleo para inhibir el desarrollo de *Fusarium moniliforme* y por ende la producción de Fumonisinás es muy prometedor.

X. PERSPECTIVAS

Se recomienda cambiar la técnica de difusión en agar por la prueba de microdilución según el método M38-A para hongos filamentos propuesta por el CLSI, esto principalmente al trabajar hongos del género de *Aspergillus*, ya que en esta técnica es mejor la manipulación de la cepa.

En estandarización del inóculo se recomienda que se realice por conteo de esporas en cámara de Neubauer de acuerdo al método M38-A para hongos filamentosos propuesto por el CLSI.

Se sugiere seguir esta línea de investigación, la cual podría enfocarse en determinar el daño causado por el propóleo en las células fúngicas, para así lograr establecer el mecanismo de acción contra *Fusarium moniliforme*.

De igual forma se propone llevar a cabo el fraccionamiento, mediante cromatografía del EEP que presentó mayor actividad, con el fin de realizar estudios dirigidos que permitan establecer los compuestos responsables de la actividad antimicótica.

Se sugiere la aplicación del propóleo de FESC in vivo para ser utilizado como control de *Fusarium moniliforme* en granos y así profundizar en su efecto y seguridad (dosis tóxica) tanto humana como del mismo grano.

Todo esto con el fin de encaminar una investigación en la elaboración de productos a base de propóleo para el control ecológico de *Fusarium moniliforme*.

Se propone seguir realizando investigación sobre el efecto que tiene el propóleo directamente sobre las toxinas producidas por los hongos *Aspergillus* y *Fusarium*.

Finalmente se sugiere seguir realizando trabajos con propóleos de México para poder justificar científicamente la necesidad de establecer Normas Mexicanas que regulen la calidad de los propóleos con el fin de estandarizarlos y asegurar su calidad y eficacia, ya que actualmente son muy utilizados en la elaboración de diversos productos naturales terapéuticos.

XI. REFERENCIAS

- Aceves, E.T.J., Virgen, C. G., Posos, P. P. y Contreras, P. ML. (2008). *Actividad fungicida de los propóleos sobre Fusarium oxysporum y Sclerotium rolfsii*. (Avances en la investigación científica en el CUCBA). Guadalajara: Universidad de Guadalajara.
- Barrera, N. L. L. y García, B. L. J. (2008). Actividad antifúngica de aceites esenciales y sus compuestos sobre el crecimiento de *Fusarium sp.* aislado de papaya (*Caica papaya*). *Revista UDO Agrícola*, 8(1), 33-41.
- Bauza, R. (2007). *Las Micotoxinas, una amenaza constante en la alimentación animal*. (Encuentro de nutrición y producción en animales monogástricos. IX). Montevideo, Uruguay: Universidad de la República.
- Bonifaz, A. (2012). *Micología Médica Básica*. México DF. Méndez Editores.
- Brook, P. J. y White, E. P. (1966). Fungus toxins affecting mammals. *Annual Review of Phytopathology*, 4,171-192.
- Carrillo, M. L., Castillo, L. N. y Mauricio, R. (2011). Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleo de la Huasteca Potosina (México). *Información Tecnológica*, 22(5), 21-28.
- Delgado, H. M., Quijano, C. E., Pérez, M. I., Quintero, M. E. y Catzín, V. G. (2008). Actividad antimicrobiana del propóleo recolectado por *Apis mellifera* y *Melipona beecheii* B. en el estado de Yucatán. *Revista de Facultad de Ingeniería Química UADY*, 47, 10-17.
- Domínguez, G. L. (2010). *Evaluación de la capacidad antifúngico del Quitosan proveniente del hongo Mucor rouxsii y de camarón contra el hongo Fusarium moniliforme que afecta al maíz*. (Tesis inédita de Licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, México.
- Fernández, H. R. (1990). Identificación de los organismos causantes de la pudrición de mazorcas de maíz (*Zea mayz* L.) en Honduras. *Ceiba Revista científica y tecnológica de la Escuela Agrícola Panamericana*, 31(1), 15-20.
- Franco, N. E. I. (2006). *Aplicación de métodos de referencia para el estudios de sensibilidad antifúngica: documentos M27-A2 y M38-A del NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards)*. (Tesis inédita de Licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, México.

- García, A. G. y Martínez, F. R. (2010). Especies de *Fusarium* en granos de maíz recién cosechado y desgranado en el campo en la región de Ciudad Serdán, Puebla. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 81(15), 15-20.
- García, L. S., Espinosa, C. C. y Bergvinson, D. J. (2007). *Manual de plagas en granos almacenados y tecnologías alternas para su manejo*. México: Ediciones CIMMYT.
- Ghaly, M. F., Ezzat, S. M. y Sarham, M. M. (1998). Use of propolis and ultragriseofulvin to inhibit aflatoxigenic fungi. *Folia Microbiol*, 2(43), 156-160.
- Giraldo, C., Velásquez, M. M. y Correa, L. A. (2010). Infección diseminada por *Fusarium sp.* en un paciente con anemia aplásica. *Revista Asoc Colomb Dermatol*, 18, 225-232.
- González, G. A. y Bernal, M. R. (1997). *Propóleos: una camino hacia la salud*. México, Guadalajara: Ediciones Cuarto día.
- Gonzales, P. E. (2010). Situación actual y perspectiva de la apicultura en México. *Claridades Agropecuaria*, 207, 3-34.
- González, S. A. (2009). *Diagnóstico y control de especies de Aspergillus productoras de Ocratoxina A*. (Tesis inédita de Doctorado). Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Ciencias Biológicas, Madrid.
- Gutiérrez, H. E. (2011). *Actividad antimicrobiana y perfil químico de propóleos Mexicanos sobre cepas de Pasterella mutocides aisladas de conejos*. (Tesis inédita de Maestría). Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, México.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2012). *La Apicultura en la Península de Yucatan. Censo agropecuario 2007 - 2012*. Recuperado de <http://www.inegi.org.mx>.
- Khezri, M., Rostami, S., Saber, R. R. y Alizadeh, A. (2006). Effect of propolis and clotrimazole on controlling aflatoxin in Pistachio (*Pistacia vera L.*). *International Journal of Agriculture and Biology*, 5(8), 606-608.
- Laurá De Calafell, M. C., González, A. M., Basílico J. C., Sarsotti, F. P. V., Gómez, R. G. y Freyre, B. L. (1997). *Introducción al estudio de la Micología*. Argentina: Ediciones Universidad Nacional del Litoral.
- Lazo, R. F. y Sierra, G. (2008). Investigación del efecto de las Micotoxinas en el ser humano. *Revista Iberoamericana de Micología*, 25, 7-11.
- Londoño, O. A. (2010). *Estudio comparativo de la actividad antifúngica de un extracto de propóleo mexicano y de tres plantas que Apis mellifera usa para su producción*. (Tesis inédita de doctorado). Instituto Tecnológico de Costa Rica, México.

- Londoño, O. A., Penieres, C. J. G., García, T. C. G., Carrillo, M. L., Quintero, M. M. L., García, V. S. E., Mendoza, S. M. A. y Cruz, S. T. A. (2008). Estudio de la actividad antifúngica de un extracto de propóleo de la abeja *Apis mellifera* proveniente del estado de México. *Tecnología en Marcha*, 21(1), 49-55.
- López, Z. C. I. (2012). *Evaluación in vitro del efecto del propóleo sobre *Microsporum gypseum**. (Tesis inédita de Licenciatura). Universidad Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan, México.
- Martínez, G. J. P. (2009). *Caracterización fisico-química y evaluación de la actividad antifúngica de propóleos recolectados en el suroeste antioqueño*. (Tesis inédita de Maestría). Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Medellín.
- Martínez, L. M. R. y Anadón, N. A. (2012). *Micotoxinas*. Madrid: Ediciones Díaz de Santos.
- Moreno, M. E. (1998). *Manual para la identificación de hongos en granos y sus derivados*. México: Ediciones UNAM.
- Özcan, M. (1999). Antifungal properties of propolis. *Grasas y Aceites*. 50(5), 395-398.
- Palomino, G. L. R., Martínez, G. J. P., García, P. C. M., Gil, G. J. y Durango, R. D. L. (2010). Caracterización Fisicoquímica y Actividad Antimicrobiana del Propóleos en el Municipio de La Unión (Antioquia, Colombia). *Revista Facultad Nacional de Agronomía-Medellín*, 63(1), 373-5383.
- Quintero, M. M. L., Londoño, O. A., Soto, Z. C. I., García, T. C. G., Carrillo, M. L., Penieres, C. J. G. y Cruz, S. T. A. (2011). Structural and genetic alterations of fungal cells caused by mexican propolis. *Formatex*, 1068-1073.
- Ramírez, C. J. A. (2006). *Contribuciones para mejorar la producción de café en Santiago Atitlán, Sololá*. (Tesis inédita de licenciatura). Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía, Guatemala.
- Rippon, J. W. (1990). *Micología Médica*. Pennsylvania USA: Ediciones Mc Graw Hill.
- Robledo, M. L., Marín, S. y Ramos A. J. (2001). Contaminación natural con micotoxinas en maíz forrajero y granos de café verde en el Estado de Nayarit (México). *Revista Iberoamericana de Micología*. 18, 142-144.
- Rojas, N., Cano, C. y Martínez, P. (1998). *Acción antifúngica de extractos de propóleo*. (Simposio sobre los efectos del propóleos en la salud humana y animal. No1). Varadero, Cuba.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo rural, Pesca y Alimentación. (2003). *Situación Actual y Perspectiva de la Apicultura en México*. Recuperado de <http://www.aserca.gob.mx/siesa/claridades/marcos.asp?numero=199>.

Literatura citada

- Soriano del Castillo, J. M. (2007). *Micotoxinas en los alimentos*. España: Ediciones Díaz de Santos.
- Tapia, S. M., García, P. O. D., Nieto, L. M., Ricque, M. D., Villarreal, C. D. y Cruz, S. L. E. (2010). *Uso de secuestrantes para disminuir la toxicidad de micotoxinas en alimentos para acuicultura*. (Simposio Internacional de Nutrición Acuícola, X). San Nicolás de La Garza, Nuevo león: Universidad Autónoma de Nuevo león.
- Uribarren, B. T., y Castañón, O. L. R. (2012). *Recursos en Micología. Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina. UNAM*. Recuperado de <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/micologia/generalidades.html>.
- Valencia, G. M. F. (2009). *Caracterización enzimática de cepas de Fusarium aisladas de lesiones de animales, humanos y plantas*. (Tesis inédita de Licenciatura). Ponticia Universidad Jeveriana, Facultad de Ciencias, Bogotá.
- Wang, H. y Bun, T. N. (2002). Isolation of an antifungal thaumatin-like protein from kiwi fruits. *Phytochemistry*, 61, 1-6.
- Ye, X. y Wang, H. (1999). First chromatographic isolation of an antifungal thaumatín-like protein from French bean legumes and demonstration of its antifungal activity. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 263, 130-134.

XII. ANEXOS

1. Agar papa dextrosa

Material:

Pulpa de papa 20g

Dextrosa 20g

Agar bacteriológico 20g

Agua destilada 1000ml

Procedimiento:

- a) Pelar la papa y cortarla en pedazos finos
- b) Poner en ebullición durante 30 minutos
- c) Filtrar a través de una gasa y reponer el volumen anterior
- d) Añadir agar glucosa
- e) Disolver por calentamiento
- f) Esterilizar en autoclave a 121°C durante 20 minutos
- g) Envasar

2. Siembra de Microcultivos

Material:

Caja Petri estéril con un portaobjetos, un cubreobjetos largo y un triángulo de vidrio.

Placa de PDA.

Procedimiento:

Fragmentar con ayuda de un bisturí la placa de PDA en cuadros de aproximadamente 1.5 x 1.5 cm.

Colocar un cubo en el portaobjetos.

Sembrar el hongo de estudio por los cuatro lados del medio de cultivo.

Colocar el cubreobjetos sobre el cubo de medio de cultivo.

Agragar a la caja Petri de 10 a 15 mL de agua glicerinada (5%).

Sellar la caja Petri con cinta adhesiva.

Incubar según la especie de hongo de estudio.

Realizar tinción de azul de algodón al portaobjetos y cubreobjetos.

3. Azul de lactofenol (Azul de algodón)

Material:

Azul de algodón (de anilina) 0.05g

Glicerol 40mL

Fenol (cristales) 20g

Ácido láctico 20mL

Agua destilada 20mL

Preparación:

Disolver el fenol en ácido láctico, después agregar agua y glicerol, calentar ligeramente y por último, adicionar el azul de algodón.

4. Antifúngicos

Tabla 12 Información general de los Antifúngicos utilizados en la prueba de inhibición del crecimiento radial.

Antimicótico	Molécula	Presentación	Mecanismo de acción	Espectro	Efectos colaterales
Ketoconazol	Imidazol	Crema y talco Shampoo Óvulos Suspensión Tabletas	Fungistático. Inhibe síntesis de ergosterol por 14- α -esterol-desmetilasa. (interrupción de formación de membranas)	Dermatofitos Hongos levaduriformes Hongos dimorficos (Aunque está cayendo en desuso para micosis profundas y subcutáneas.)	Nauseas, diarreas, ictericias, vómito, hepatotoxicidad, leucopenia, oligospermia, ginecomastia y disminución de la libido.
Miconazol	Imidazol	Crema Gel oral	Fungistático. Inhibe síntesis de ergosterol por la 14- α -esterol-desmetilasa. (interrupción de formación de membranas)	Dermatofitos Hongos levaduriformes (<i>Candida sp.</i>)	Dermatitis por contacto, irritación de mucosas
Voriconazol	Triazol de segunda generación	Tabletas Suspensión Solución IV	Fungistático. Inhibe síntesis de ergosterol por la 14- α -esterol-desmetilasa. (interrupción de formación de membranas)	<i>Candida spp.</i> , infecciones severas diseminadas en piel, a nivel abdominal y renal; como tratamiento de rescate en infecciones por <i>Scedosporium apiospermum</i> y <i>Fusarium spp.</i> Se ha reportado su uso efectivo en infecciones óseas, del SNC, endoftalmitis y queratitis micótica por <i>Aspergillus spp.</i> , <i>Fusarium spp.</i> Y <i>Pseudallescheria boydii.</i>	Visión borrosa, fotopsias, fotofobia, alucinaciones visuales y alteraciones en la percepción de los colores; náusea, vómito, aumento transitorio de enzimas hepáticas, hepatotoxicidad. Erupciones cutáneas, pseudoporfiria, síndrome de Stevens-Johnson y necrólisis epidérmica tóxica
Anfotericina B	Polieno heptaeno	Solución inyectable	Fungistático y fungicida interrumpe la formación de membranas	Dermatofitos Blastomicetos <i>Candida spp.</i> <i>C. neoformans</i> <i>Rhodotorula spp.</i> Hongos dimorficos. <i>Aspergillus spp.</i>	Agudos: fiebre, escalofríos, náusea, vómito, cefalea tromboflebitis, hipertensión mialgias, broncoespasmo, artralgias y arritmias. Crónicos: nefrotoxicidad, alteraciones electrolíticas y anemia.