



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLÁN

EVALUACIÓN *in vitro* DEL EFECTO ANTIMICÓTICO DEL  
PROPÓLEO SOBRE *Trichophyton mentagrophytes*.

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**P R E S E N T A:**

**MÓNICA MARTÍNEZ RAMÍREZ**

ASESOR: DR. TONATIUH A. CRUZ SÁNCHEZ

COASESOR: DRA. AMPARO LONDOÑO OROZCO

CUAUTITLÁN, IZCALLI EDO. DE MÉXICO 2013.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



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**

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



**DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO  
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE**

**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 antimicótico del propóleo sobre Trichophyton mentagrophytes**

Que presenta la pasante: Mónica Martínez Ramírez

Con número de cuenta: 305307547 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 22 de agosto de 2013.

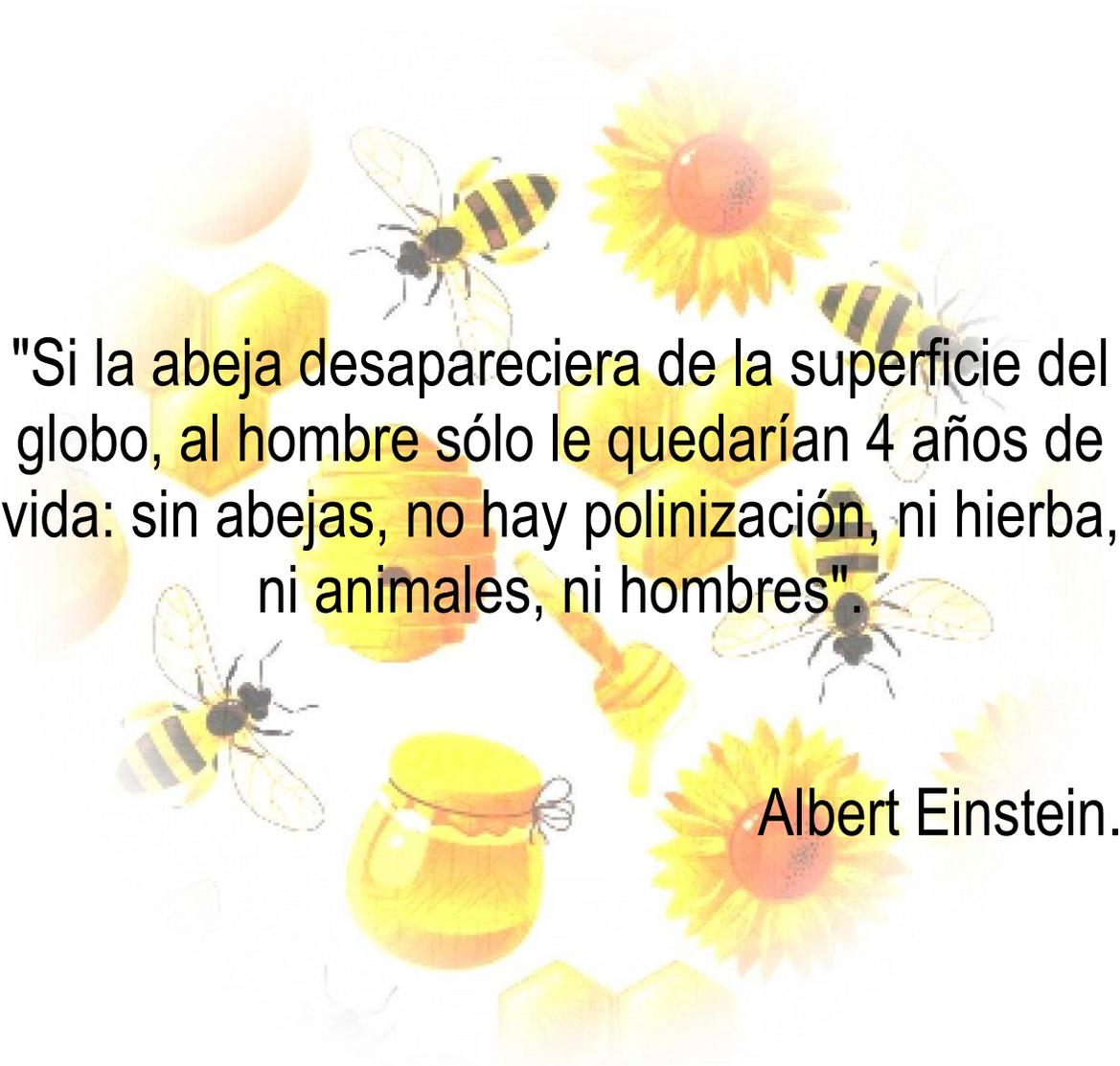
**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	Dr. Tonatihu Alejandro Cruz Sánchez	
<b>VOCAL</b>	M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez	
<b>SECRETARIO</b>	Dra. Alma Lucila Nuñez del Arco	
<b>1er. SUPLENTE</b>	QFB. Leticia Cubillo Carrillo	
<b>2do. SUPLENTE</b>	QFB. Verónica Ruiz Solorio	

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

Este trabajo forma parte del proyecto DGAPA-PAPIIT 223811-3: Perspectivas del uso del propóleo en la salud animal, y sé brindo una beca por parte del mismo para poder llevarse a cabo.

Fue realizado en las instalaciones del Laboratorio de Microbiología (Lab.6) de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, en Campo 4.



"Si la abeja desapareciera de la superficie del globo, al hombre sólo le quedarían 4 años de vida: sin abejas, no hay polinización, ni hierba, ni animales, ni hombres".

Albert Einstein.

## DEDICATORIAS

Quisiera expresar mi agradecimiento a todas las personas que estuvieron conmigo a lo largo de este logro que hoy veo finalizado.

A Dios y a la vida por regalarme esa hermosa familia que tengo y por dejarme llegar a donde estoy; por permitirme caer y levantarme; por todas las experiencias que hasta el día de hoy me han proporcionado sabiduría, fuerza y han formado lo que soy. Quiero agradecer a mis Padres: mi Lucy, eres mi admiración y mi fuerza, eres una gran mujer, un gran ser humano y un ejemplo de vida; Papá mi pilar, un ejemplo de éxito, constancias, fortaleza, posibilidad, en una palabra mi inspiración. A mis hermanos Oscar y Rosario, gracias por ser ustedes, por motivarme y por siempre creer en mí; a mi angelito Santi, porque aunque aún eres un niño tu llegada cambio mi vida y la de todos, tus sonrisas me alentaron, porque verte crecer ha sido un gran regalo que Dios y la vida me han dado; solo me queda decir gracias... Los amo inmensamente.

A ti, padrino Juan Manuel por siempre estar al pendiente de mí, de mi familia y compartir conmigo los momentos importantes, gracias por tu cariño.

A la persona que ha compartido conmigo mis sueños, mis tristezas, mis fortalezas y mis debilidades, porque eh tenido la dicha de tener a mi amigo y mi compañero en una sola persona, gracias Memo por ser tú y por acompañarme en este camino.

Finalmente a la familia que Dios me permitió escoger y que puso en mi camino: Gabriel, Martín, Anel, Moisés, Mariana, David, Richie, Oscar, Saraí; quiero agradecerles por acompañarme en este camino que hoy veo finalizado, gracias por compartir conmigo mis alegrías, mis tristezas, mis logros e infinidad de vivencias que ustedes bien saben, y por permitirme formar parte de sus vidas, en mi corazón me llevo un pedacito de todos ustedes, gracias por el cariño que siempre me brindan y lo más importante por regalarme su amistad.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México mi alma mater, por brindarme los conocimientos que hoy poseo y por permitirme ser un ciudadano productivo para mi país.

A mis asesores el Dr. Tonatiuh A. Sánchez Cruz y la Dra. Amparo Londoño Orozco por permitirme trabajar con ustedes, gracias por la confianza que me brindaron, por los conocimientos y experiencias compartidas; por creer en mí y motivarme a seguir superándome.

Gracias al Dr. Liborio, Dr. Marco, a Male por su apoyo y amabilidad. También quisiera agradecer a Ale y Chris por compartir sus conocimientos e información conmigo.

A Elly por su apoyo, confianza, pero principalmente por regalarme su amistad y su cariño. A mi colega y a veces asesora Anel por su apoyo; a Denisse por su amistad y cariño, y porque gracias a ustedes mi estancia fue muy amena y agradable.

Quisiera agradecer al profesor Alberto Natahliel Soto Guevara por su colaboración y por ser un ejemplo para mí.

Por último y no menos importante, quisiera agradecer a aquellos profesores que marcaron mi formación académica, que me inspiraron a superarme día con día. Algunos de ellos con los que eh tenido la fortuna de poseer su amistad y cariño: Marina Lucia Morales Galicia, Mauricio Vicuña Gómez y Guillermo Penieres Carrillo.

## ABREVIATURAS.

µg = microgramos.

mg = miligramos.

gr = gramos.

Kg = kilogramos.

mL = mililitros.

mm = milímetros.

°C = grados Celsius.

EEP = Extracto Etanólico de Propóleo.

CMI = Concentración Mínima Inibitoria.

CFM = Concentración Fungicida Mínima.

KOH = Hidróxido de Potasio.

DL50 = Dosis Letal 50.

DTM = Medio para la prueba de dermatofitos (del ingles Dermatophyte Test Medium).

PAS = Ácido Peryódico de Schiff ( del ingles Periodic acid-Schiff).

CAPE = Ácido Caféico Fenetil Ester.

ADP = Agar Dextrosa-Papa.

CTR = Clotrimazol.

VCZ = Voriconazol.

KET = Ketoconazol.

MCZ = Miconazol.

# ÍNDICE

	Página
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
1. PROPÓLEO.....	2
2. COMPOSICIÓN QUÍMICA.....	3
3. ACTIVIDAD BIOLÓGICA.....	4
3.1. Actividad antimicrobiana.....	5
3.2. Actividad antimicótica.....	5
3.3. Actividad antiparasitaria.....	6
3.4. Actividad antiviral.....	6
3.5. Actividad antiinflamatoria y cicatrizante.....	7
3.6. Actividad antioxidante.....	7
4. MICOSIS.....	8
5. CLASIFICACIÓN DE LAS MICOSIS.....	8
6. ESTRUCTURAS QUERATINIZADAS.....	11
6.1. Pelo.....	11
6.2. La Piel.....	12
6.3. Uña.....	14
7. DERMATOFITOSIS.....	15
8. DERMATOFITOS.....	15
9. CLASIFICACIÓN DE DERMATOFITOS.....	17
10. DERMATOFITOSIS CAUSADA POR <i>T. mentagrophytes</i> .....	18
10.1. Características generales.....	18
11. DIAGNÓSTICO Y AISLAMIENTO.....	18
12. TRATAMIENTO.....	19
OBJETIVOS.....	26
HIPÓTESIS.....	26
DISEÑO EXPERIMENTAL.....	27
MATERIALES Y MÉTODOS.....	28
RESULTADOS.....	31
DISCUSIÓN.....	51
CONCLUSIONES.....	55
PERSPECTIVAS.....	56
BIBLIOGRAFÍA.....	57

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
Figura 1. Estructura del pelo.....	12
Figura 2. Anatomía de la piel.....	13
Figura 3. Estructura de la uña.....	14
Figura 4. Estructura Química de la Griseofulvina.....	22
Figura 5. Composición Química del Fluconazol.....	23
Figura 6. Estructura Química de la Terbinafina.....	24
Figura 7. Desarrollo colonial de <i>T. mentagrophytes</i> en Agar Borelli.....	31
Figura 8. <i>T. mentagrophytes</i> , presencia de hifas en espiral.....	32
Figura 9. Tinción azul de algodón.....	33
Figura 10. Urea de Rustigian y Stuart para <i>T. mentagrophytes</i> .....	34
Figura 11. Inhibición crecimiento radial a los 7 días de incubación.....	35
Figura 12. Inhibición crecimiento radial a los 10—12 días incubación.....	36
Figura 13. Sensibilidad de <i>T. mentagrophytes</i> frente a 2 antifúngicos: Clotrimazol y Miconazol.....	37
Figura 14. Sensibilidad de <i>T. mentagrophytes</i> frente a 2 antifúngicos: Ketoconazol y Voriconazol.....	38
Figura 15. Determinación de la CMI para <i>T. mentagrophytes</i> .....	39
Figura 16. Determinación de la CFM para <i>T. mentagrophytes</i> .....	41
Figura 17. Estructuras celulares de <i>T. mentagrophytes</i> muestra control, vista 40x.....	43
Figura 18. Daño efectuado sobre hifa de <i>T. mentagrophytes</i> a una conc. de 0.25 mg/mL de EEP vista en 40x.....	44

Figura 19. Daño efectuado sobre hifa de <i>T. mentagrophytes</i> a una conc. de 0.5 mg/mL de EEP vista en 40x.....	45
Figura 20. Daño efectuado sobre hifa de <i>T. mentagrophytes</i> a una conc. de 1.0 mg/mL de EEP vista en 40x.....	46
Figura 21. Daño efectuado sobre hifa de <i>T. mentagrophytes</i> a una conc. de 1.5 mg/mL de EEP vista en 40x.....	47

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Página</b>
Tabla No. 1. Principales componentes químicos del propóleo.....	4
Tabla No. 2. Clasificación Clínica de las Micosis.....	10
Tabla No. 3. Algunas características clínicas de la infección por dermatófitos.....	16
Tabla No. 4. Hábitat de los dermatofitos más frecuentes en México.....	17
Tabla No. 5. Antifúngicos tópicos.....	21
Tabla No. 6. Determinación de CMI de EEP en Placa de 24 pozos.....	40
Tabla No. 7. Determinación de CFM de EEP frente a <i>T. mentagrophytes</i> .....	42

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

	<b>Página</b>
Gráfica 1. Dilución en Placa <i>T. mentagrophytes</i> .....	40
Gráfica 2. CFM para <i>T. mentagrophytes</i> .....	42
Gráfica 3. Daño celular del EEP sobre el diámetro de las hifas de <i>T. mentagrphytes</i> .....	48
Gráfica 4. Evaluación del diámetro de microconidios después del tratamiento con diferentes concentraciones de EEP.....	49
Gráfica 5. Evaluación del número de microconidios por campo después del tratamiento con diferentes concentraciones de EEP.....	50

## Resumen

El propóleo es una sustancia que las abejas obtienen de las cortezas y brotes de los árboles, y al mezclarse con sus secreciones es procesado. 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 y las cuencas hidrográficas entre otros.

Se han reportado diversas actividades biológicas y farmacológicas del propóleo, de las cuales la que más nos interesa destacar en el presente trabajo es la actividad antimicótica. Diversos autores han establecido esta actividad, luego de considerar a compuestos como: la pinocebrina, galangina, ácido benzoico, ácido salicílico, vainillina, mono y sesquiterpenos; como los principales compuestos responsables de esta actividad debido a sus propiedades fungicidas.

En el presente trabajo se buscó evaluar el daño celular producido por el Extracto Etanólico de Propóleo (EEP), proveniente del Apiario de la FES-Cuautitlán; sobre uno de los principales agentes etiológicos causales de las micosis superficiales: *Trichophyton mentagrophytes*. Nuestros resultados demostraron, mediante técnicas de difusión en placa, empleando la prueba de Inhibición de Crecimiento Radial, determinación de CMI y CFM, así como el daño celular para evaluar el efecto producido por el extracto etanólico de Propóleo sobre *Trichophyton mentagrophytes*.

Los resultados obtenidos, nos muestran que el EEP presentó un efecto fungistático; encontrando además una CMI de 0.5 mg/ml, así como un efecto fungicida con una CFM de 1.0 mg/mL; aunado a ello, estructuralmente a nivel celular se pueden observar modificaciones en las hifas y una disminución del número de microconidios de *Trichophyton mentagrophytes*. La evaluación del daño celular permitió determinar que el EEP en contacto directo con el dermatofito, causa alteraciones estructurales a nivel citoplasmático, de manera presuntiva. Esta afirmación está basada en el vaciamiento del contenido celular de las hifas, aunque en lo que respecta a los microconidios, no se aprecia modificación celular aparente, pero sí se logra ver una disminución en cuanto a número. Específicamente a partir de la concentración de 0.25 mg se logran apreciar alteraciones a nivel estructural por el vaciamiento fraccionado el material intracelular siendo las más representativas las de, 0.5 mg para la CMI y 1.0 mg para CFM del Extracto Etanólico de Propóleo.

Este trabajo representa un complemento importante para la terapia antifúngica actual, ya que como se ha señalado en diversos artículos (Marccuci, 1995; Fernández y col., 2005), el propóleo produce un sinergismo con los antimicóticos convencionales; además de poseer propiedades antiinflamatorias (en los casos graves de dermatofitosis), así como hepatoprotectoras (González y col. 1994) ante la conocida hepatotoxicidad de los principales antifúngicos empleados en la actualidad.

# Introducción

## 1. Propóleo.

El Propóleo es una sustancia de origen natural elaborada por las abejas melíferas (*Apis mellifera*), que posee propiedades terapéuticas reconocidas, y que ha sido empleada extensamente desde tiempos antiguos.<sup>18</sup> El propóleo y sus usos se conocen desde hace al menos 3,000 años. Los sacerdotes del antiguo Egipto lo utilizaron como medicina y como un ungüento o crema para embalsamar los cadáveres, especialmente para “conservar” las vísceras de los faraones.<sup>9</sup>

Aristóteles en su obra “Historia de animales”, considerando el uso del propóleo como remedio para las infecciones de la piel, llagas y supuraciones<sup>8</sup>. El propóleo es también utilizado por los incas para el tratamiento de infecciones febriles.<sup>9</sup> En los siglos XVI y XVIII los franceses lo empleaban para el tratamiento de heridas.

Su empleo máximo se observó durante la Guerra de los Boers (1899-1902) en el sur de África (inmediatamente antes de la Primera Guerra Mundial), y la Revolución Rusa, en ambos casos, empleaban un ungüento a base de vaselina y propóleo para curar heridas, no sólo como antiséptico, sino para fomentar la curación y regeneración de tejidos y su uso ha continuado hasta nuestros tiempos.<sup>9</sup>

La palabra propóleo se deriva del griego, << *pro* >> que significa delante de, y << *polis* >>, ciudad<sup>8</sup>: por lo que es una sustancia utilizada por las abejas para cerrar parcialmente las vías de acceso a su comunidad o ciudad.<sup>9</sup> El propóleo es una sustancia natural elaborada por las abejas melíferas (*Apis mellifera*), a partir de los exudados de las cortezas y diversos tejidos de las plantas. Los materiales colectados son triturados, humedecidos y mezclados con la cera producida por las glándulas céricas y finalmente transportados hacia la colmena<sup>18</sup>. Su consistencia es resinosa, balsámica, gomosa, de consistencia viscosa y color verde pardo, castaño, rojo o incluso casi negro-dependiendo de su origen botánico-, sabor acre, frecuentemente amargo, y olor agradable y dulce. <sup>9</sup>

La abejas emplean el elemento de propolización de la colmena, como mecanismo de defensa ante las amenazas que representa el medio externo; de igual manera se garantiza así la asepsia de las misma. Además de lo anterior, las abejas emplean el mecanismo de propolización con diversos fines, tales como:

- ▲ Tapar grietas o quebraduras.
- ▲ Evitar la entrada de frío, depredadores y visitas indeseables.
- ▲ Tapizar el interior de la celdilla previo a la puesta de la reina, así como sellarlas, manteniéndolas libres de agentes microbianos.
- ▲ Evitar las vibraciones de la colmena a causa de corrientes de aire y los sonidos intensos.
- ▲ Aislante térmico.
- ▲ Embalsamar para momificar y aislar los restos de animales en el interior de la colmena, cuando resulten grandes o pesados para expulsarlos.<sup>8</sup>

## 2. 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 y las cuencas hidrográficas entre otros. La vegetación que rodea a la colmena es de importante consideración ya que es a la que recurren las abejas.<sup>11</sup> Algunos ejemplos de éstas fuentes vegetales son: el pino, abeto, sauce, abedul, varias especies de álamo, fresno, roble, entre muchos otros que encuentren cerca de sus colmenas.<sup>11</sup> Es por esto que los propóleos de diferentes zonas geográficas poseen efectos similares pero difieren en su composición, esta variación de los componentes condicionan sus propiedades fisicoquímicas y biológicas.<sup>8</sup>

La composición exacta del propóleo crudo varía según la fuente, pero en general se compone de: resina y bálsamo en un 50%, cera un 30%, aceites esenciales y aromáticos 10%, polen 5% y varias otras sustancias 5%<sup>10</sup>, entre estos últimos podemos encontrar mezclas mecánicas, sustancias minerales y oligoelementos, desechos orgánicos y vitaminas en pequeñas proporciones.<sup>8</sup>

Se han descrito cerca de 50 compuestos fenólicos como ácidos bezoicos, ácidos cinámicos, ácidos cafeicos o flavonoides entre otros<sup>19</sup>. Entre los principales componentes del propóleo, hablando en forma general se han encontrado vainilina, ácido y alcohol cinámico, terpenos, alfa cetoxi-betulenol, isovalina, ácido cafeico y felurico, galangina, crisina, tectocristina, isalpinina y pinoembrina.<sup>8</sup> Llama la atención principalmente la prevalencia de flavonoides como la pinoembrina, galangina, pinobanskina y al éter bencil del éster fenetil de ácido caféico entre otros compuestos y derivados del ácido cinámico, a los cuales se asocia la actividad biológica del propolis.<sup>11</sup>

A continuación se presentan en la Tabla No. 1. Los principales componentes químicos del Propóleo de manera general.

**Tabla No.1. Principales componentes químicos del propóleo.**

<b>Componentes</b>	<b>Ejemplos</b>
Ácidos orgánicos	Como el ácido benzoico $C_6H_5-COOH$ gálico. $C_7H_6O_5$
Ácidos fenólicos	Ácidos cafeico $C_9H_8O_4$ , cinámico $C_{11}H_{13}NO_2S_2$ , pumarínico, insofenílico y 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, pectolinnaringenina $C_{17}H_{14}O_6$ , tetocrisina $C_{16}H_{12}O_4$
Flavonoles	Izalquinina, Kaempferido $C_{16}H_{12}O_6$ , quercetina $C_{15}H_{10}O_7$ , remnocitrina
Flavononas	Pinostrobrina $C_{16}H_{14}O_4$ , sakuranetina $C_{16}H_{14}O_5$
Flavononoles	Pinobanksina, ferólico, los sesquiterpenos y las flavononas (principalmente la galangina $C_{15}H_{10}O_5$ )
Minerales	Aluminio, plata, bario, boro, cromo, cobalto, cobre, estaño, hierro, magnesio, manganeso, molibdeno, níquel, plomo, silicio, estroncio, titanio, vanadio, etc.
Vitaminas	Provitamina A y Provitamina B3

(Gutiérrez E., 2011).

### 3. Actividad Biológica.

La bibliografía reporta un gran número de trabajos relacionados con la actividad biológica y farmacológica del propóleo; sin embargo, la cantidad de estudios que reportan compuestos puros con actividad específica obtenidos de este material es muy reducida, y las aplicaciones son muy diversas y heterogéneas.<sup>18</sup> Diversos investigadores han reportado que el propóleo posee diversas actividades biológicas, entre las cuales destacan las siguientes:

- ▲ Actividad Antibacteriana.
- ▲ Actividad Antimicótica.
- ▲ Actividad Antiparasitaria.
- ▲ Actividad antiinflamatoria, cicatrizante y anestésica.
- ▲ Actividad Antioxidante.
- ▲ Actividad Inmunomoduladora.
- ▲ Actividad antitumoral.
- ▲ Actividad vasoprotectora.

### 3.1. Actividad Antimicrobiana.

Se ha demostrado que la actividad antimicrobiana del propóleo se da gracias al sinergismo de sus componentes y no de un solo componente.<sup>11</sup> La literatura reporta que el mecanismo de la actividad antimicrobiana es complicado y podría atribuirse a un sinergismo entre los flavonoides, los hidroxiácidos y los sesquiterpenos.<sup>14</sup>

Algunos reportes han permitido reconocer como componentes fundamentales a los ácidos oxibenzoico, metoxibenzoico, cafeico y ferúlico, los sesquiterpenos, principalmente el bisabolol y las flavonas como la galagnina principalmente. Otros investigadores consideran también a los flavonoides pinocembrina, pinobanksina, pinobanksina-3-acetato, así como el éster bencílico del ácido p-cumárico y las mezclas de ésteres del ácido cafeico como elementos de acción antibacteriana.<sup>8</sup>

Aunque se conoce muy poco sobre el mecanismo de acción bactericida o bacteriostática de cada uno de los compuestos mencionados; existen reportes que indican que el ácido cinámico y algunos flavonoides son los responsables de desacoplar la transducción de energía de la membrana plasmática inhibiendo la motilidad bacteriana. Así mismo se ha determinado que el propóleo desorganiza la membrana citoplasmática, la pared celular y el citoplasma, provocando una bacteriólisis parcial acompañado de inhibición en la síntesis de proteínas.<sup>13</sup> También se ha encontrado que el ácido ferúlico actúa frente a microorganismos Gram positivos y Gram negativos, de la misma manera se ha descubierto que los ácidos fenilcarbónicos poseen una acción directa a nivel de la membrana celular de los microorganismos para provocar su destrucción.<sup>8</sup>

Entre los microorganismos en los que se ha probado su acción antibacterial se encuentran:

- ▲ *Staphylococcus aureus*.<sup>8,12</sup>
- ▲ *Bacillus subtilis*.<sup>8,12</sup>
- ▲ *Escherichia coli*.<sup>8,12</sup>
- ▲ *Salmonella typhimurium*.<sup>12</sup>
- ▲ *Salmonella enteritides*.<sup>12</sup>
- ▲ *Helicobacter pylori*.<sup>12</sup>
- ▲ *Streptococcus pyogenes*.<sup>12</sup>
- ▲ *Mycobacterium sp.*<sup>12</sup>
- ▲ *Staphylococcus epidermidis*.<sup>14</sup>
- ▲ *Pseudomonas aeruginosa*.<sup>14</sup>

### 3.2. Actividad Antimicótica.

Las propiedades antimicóticas del propóleo han sido establecidas por numerosos autores, luego de considerar a compuestos como: la pinocembrina, galangina, ácido benzoico, ácido salicílico, vainillina, mono y sesquiterpenos; como los principales compuestos responsables de esta actividad debido a sus propiedades fungicidas.<sup>8, 11</sup>

Mediante el estudio de la actividad antifúngica de los propóleos de diferentes áreas geográficas, varios autores han encontrado que presentan efectos antifúngicos en diversos grados en muchas especies como:

*Candida albicans*, *Candida no albicans*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Malassezia pachydermatis*, *Aspergillus niger*, *Alternaria alternaria*, *Penicillium digitatum*, *Botrytis cinérea*, *Ascospaera apis* y *Plasmopara vitícola*.<sup>9</sup>

Aunque muchos estudios se han centrado en demostrar la actividad antifúngica de diferentes extractos de propóleos, pocos han reportado sus efectos sobre la morfología y estructura de los hongos. Un estudio realizado en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, de la UNAM en el Laboratorio de Microbiología de la Unidad Multidisciplinaria, ha reportado que el extracto etanólico de propóleo a concentraciones de 0.25 mg/mL, indujo la inhibición de la formación de tubos germinales así como la deformación de algunas levaduras.<sup>9</sup>

### **3.3. Actividad Antiparasitaria.**

Se ha reportado una acción antiparasitaria del propóleo, destacándose su efectividad frente a *Giardia lamblia*. En un estudio realizado por Hollands et al. (1988) valoraron la actividad de diferentes extractos alcohólicos de propóleo sobre trofozoítos de *Giardia lamblia*, y pudieron constatar un efecto antigiardiasico en solo 24 horas, tras observar, además de la inhibición del crecimiento empleando una concentración de Extracto etanólico de Propóleo de 11.6 mg/mL con un porcentaje del 98 % de inhibición<sup>14</sup> la aparición de un gran número de estos parásitos redondeados e inmóviles como evidencia de muerte.<sup>8</sup>

Por su parte, también se han realizado estudios in vitro contra *Trichomonas vaginalis* empleando soluciones de Extracto Etanólico de Propóleo a una concentración de 150 mg/mL presentando una actividad letal para este parasito.<sup>14</sup>

### **3.4. Actividad Antiviral.**

En los últimos años un volumen cada vez más extenso de esfuerzos se han dirigido a las investigaciones sobre los múltiples aspectos vinculados a la acción antiviral del propóleo. Se ha demostrado que la serie de componentes de naturaleza flavonoide revela una actividad antiviral; en particular tres compuestos presentes: apígenos, acacetinas y pectolinarígenos.<sup>8</sup>

Saiz y Colaboradores en el 2002, reportaron que uno de los principios activos aislados cromatográficamente del propóleo denominado Acido Cafeico Fenetil Ester (CAPE) presenta actividad en la transformación viral causada por Adenovirus tipo 5, sin afectar a las células normales.<sup>19</sup>

También se han empleado para otros fines, Bojnansky y Kosljarova (1975) estudiaron los efectos inhibitorios de una solución de propóleos al 10% frente a tres especies de virus; causantes del mosaico del pepino, de la mancha del tabaco y de la necrosis del tabaco, los autores concluyeron que la sensibilidad más elevada correspondió al virus de la necrosis del tabaco, evidenciándose para el virus del mosaico del pepino una sensibilidad más reducida.<sup>8</sup>

### 3.5. Actividad Antiinflamatoria y Cicatrizante.

Existen diversas investigaciones que indican que el propóleo tiene propiedades reconstructivas y de cicatrización de heridas. Asis (1989) considera que la capacidad de acelerar ostensiblemente la epitelización y división celular en la curación de heridas, y la prevención y detención del desarrollo de procesos inflamatorios. Esta última actividad está relacionada con las flavonas, principalmente glucósidos que aparecen en el propóleo en forma de agluconas libres y los metoxiflavonoides respectivamente. Su intervención se cree está fundamentada a que estos compuestos tienen actividad a nivel de los mediadores de la inflamación <sup>8</sup>.

Otros autores reportan que el propóleo presenta un efecto antiinflamatorio sobre la piel. Ivanovska *et. al.* (1995) observó una significativa reducción de la inflamación aguda en ratones, administrada por vía oral a una dosis de 150 mg/kg. Later, Krol *et. al.* Han estudiado 19 compuestos fenólicos que presentan actividad antiinflamatoria, entre los que se encuentran: ácido salicílico, ácido gálico, ácido cinámico, ácido o-cumárico, ácido 3,4-dimetoxycinámico, galanina, entre otros. <sup>12</sup>

Por su parte, Strehl *et.al.* (1994) consideran, que los extractos acuosos y etanólicos del propóleo han indicado una sustancial actividad antiinflamatoria. Sus estudios revelan que uno de los mecanismos de acción de este producto puede relacionarse con la inhibición de la enzima hidrofolato reductasa, posiblemente por actividad del ácido cafeico presente en el propóleo.<sup>8</sup>

### 3.6. Actividad Antioxidante.

Hoy en día nos enfrentamos con diversos factores predisponentes que aceleran la aparición de trastornos como: trastornos cardiovasculares, reumatismo, diabetes, padecimientos cerebrovasculares, cáncer, así como envejecimiento prematuro. Algunos agentes externos capaces de producir radicales libres tales como las radiaciones, rayos ultravioleta, exposición al sol, metales tóxicos, el ozono, etc. Estas moléculas atacan los lípidos como grasas insaturadas, provocan reacciones de peroxidación que darán lugar a la formación de otros radicales libres. El organismo lucha de forma natural contra estos elementos dañinos, y para ello produce las enzimas superóxidasa dismutasa y glutathione peroxidasa, las cuales se encargan de bloquear su formación o su destrucción una vez formados. Estudios revelan que algunos antioxidantes como las vitaminas A, C y E, selenio y zinc algunos de estos elementos presentes en el propóleo intervienen directamente destruyendo los radicales libres o estimulando la liberación y potencializando su acción o interviniendo en sus síntesis<sup>8</sup>.

Esta propiedad se atribuye a componentes como las flavonas y algunos compuestos fenólicos, y se cree que debido a su propiedad antioxidante puede proteger al ser humano del proceso oxidativo.

La micología es la rama de la Biología que tiene por objetivo el estudio de los hongos, su importancia médica radica en la capacidad de producir enfermedades al ser humano como son: Hipersensibilidades (alergias), Infecciones (micosis) e Intoxicaciones (micotoxicosis y micetismo); es por ello la importancia de su estudio.

#### 4. Micosis.

Las infecciones de origen fúngico son denominadas micosis, estas pueden clasificarse en función del tejido infectado y las características específicas de cada grupo de microorganismos<sup>48</sup>; su adquisición depende de factores predisponentes, tales como edad, ocupación, embarazo, quemaduras, inmunodepresión, quimioterapia, radioterapia, uso de catéteres, procesos malignos o enfermedades metabólicas en las personas. Las formas infectantes se adquieren habitualmente del ambiente, ya sea por contacto directo, por inhalación, lesiones de continuidad o incluso pueden provenir de la microbiota normal.<sup>1</sup>

#### 5. Clasificación de las Micosis.

La clasificación médica de las micosis, está basada en el grado de compromiso tisular, el modo de ingreso al hospedador y hospedero<sup>2</sup> y en pos de las características específicas de cada grupo de microorganismos. Este sistema de clasificación permite distinguirlos en 4 grupos.<sup>48</sup>

- **Superficiales o cutáneas.** Son aquellas que se limitan al estrato queratinizado de la piel y o del pelo<sup>4, 48</sup>, que pueden o no presentar evidencia de inflamación<sup>49</sup> y muy poca evidencia clínica de la enfermedad.<sup>4</sup> Se localizan a lo largo de los tallos pilosos y en las células epidérmicas. La infección se transmite entre los seres humanos o de un animal a un ser humano<sup>2</sup> (por lo que se le denomina zontica) por contacto directo con pelos y células epidérmicas infectadas.<sup>2</sup>
  
- **Subcutáneas.** Infecciones micóticas que se producen debajo de la piel y son causadas por hongos saprófitos que viven en el suelo y sobre la vegetación.<sup>2</sup> Agrupan a un conjunto muy heterogéneo de infecciones fúngicas producidas por hongos taxonómicamente muy diversos, que generalmente alcanzan el tejido celular subcutáneo por inoculación traumática. Son procesos habitualmente limitados a la piel y al tejido celular subcutáneo, que evolucionan muy lentamente formando granulomas o queloides, sin que suela existir diseminación sistémica.<sup>4</sup>
  
- **Sistémicas.** Son infecciones micóticas profundas en las que se produce infección de los órganos internos y en muchos casos una diseminación hematógena<sup>49</sup>. Este tipo de micosis suelen ser producidas por hongos que habitan en el suelo, por lo regular la vía de transmisión es la inhalación de esporas y estas infecciones comienzan de modo típico en los pulmones y luego se diseminan a otros tejidos corporales. No se contagian del animal a los seres humanos ni hay contagio interpersonal.<sup>2</sup>

- **Oportunistas.** Enfermedades producidas por patógenos oportunistas que en un ser humano inmunológicamente competente suele ser inocuo en su hábitat normal pero suele tornarse patógeno en un hospedero que está debilitado o traumatizado que se halla en tratamiento con antibióticos de amplio espectro, que tiene un sistema inmunitario suprimido por fármacos o por algún trastorno, o que sufre una enfermedad pulmonar.<sup>2</sup> Estos hongos normalmente se desarrollan como comensales en el ser humano o de forma libre en el medio ambiente.<sup>48</sup>

Tabla No. 2. CLASIFICACIÓN CLINICA DE LAS MICOSIS			
Tipos	Enfermedad	Hongo (Género)	Ejemplo
<b>Superficial:</b> Capas externas de piel (epidermis), cabello, uñas, mucosas	Pitiriasis versicolor Tiña negra Dermatofitosis	<i>Malassezia</i> <i>Hortaea</i> <i>Trichophyton</i> <i>Microsporum</i> <i>Epidermophyton</i>	
<b>Subcutáneo:</b> Dermis, tejido subcutáneo y músculo	Eumicetoma Esporotricosis Cromoblastomicosis	<i>Madurella</i> <i>Sporothrix</i> <i>Fonsecaea</i>	
<b>Sistémico o profundo:</b> Uno o más órganos / tejidos profundos	Histoplasmosis Paracoccidioidomicosis Coccidioidomicosis	<i>Histoplasma</i> <i>Paracoccidioides</i> <i>Coccidioides</i>	
<b>Oportunista:</b> Diversos órganos.	Candidosis Criptococosis Zigomicosis	<i>Candida</i> <i>Cryptococcus</i> <i>Rhizopus</i>	

(Uribarren ,2011).

## 6. Estructuras Queratinizadas.

Los dermatofitos producen infecciones que afectan las regiones superficiales del cuerpo: como los pelos, la piel y las uñas (dermatofitosis). Los géneros *Trichophyton*, *Microsporum* y *Epiderophyton* son los agentes etiológicos principales, puesto que tienen afinidad por los órganos blancos queratinizados causantes de las micosis superficiales<sup>17</sup>.

### 6.1. Pelo.

El pelo se halla en la mayor parte de la superficie cutánea, salvo las palmas de las manos, cara palmar de los dedos de las manos y pies, y en la planta de los pies.

Cada pelo consiste en columnas de células queratinizadas muertas, que se mantienen unidas gracias a proteínas extracelulares. El tallo piloso es la porción superficial del pelo y su mayor parte se proyecta desde la superficie de la piel. La raíz es la porción profunda del pelo, penetra en la dermis y, a veces, el tejido subcutáneo. Ambas partes constan de tres capas concéntricas: la medula interior, la corteza media y la cutícula. La primera de ellas, se compone por dos o tres capas de células poliédricas que contienen gránulos de pigmentos y espacios aéreos. La segunda, forma gran parte del grosor del tallo y consiste en células alargadas, que contienen gránulos de pigmentos en el pelo oscuro y principalmente aire en el pelo canoso. Finalmente la tercera de ellas (la cutícula), es la capa externa y está compuesta por una sola hilera de células finas y planas, que son las más intensamente queratinizadas.<sup>15</sup>

La raíz del pelo está rodeada por el folículo piloso que consiste en vainas radicales interna y externa. La vaina radicular externa es la continuación descendiente de la epidermis, dicha vaina contiene todas las capas de la epidermis. La vaina radicular interna consta de una envoltura tubular entre la vaina radicular externa y el pelo.

La base de cada folículo piloso contiene una estructura llamada bulbo, el cual tiene contiene una “muesca” llamada papila del pelo, la cual posee numerosos vasos sanguíneos que nutre en folículo piloso en crecimiento. Además, el bulbo incluye una capa de células germinativas, llamada matriz. Las células de esta provienen del estrato basal, que es el sitio de división celular y es por ello que de estas células, depende el crecimiento del pelo y la producción de uno nuevo cuando se cae el antiguo.<sup>15</sup>

Las glándulas sebáceas y los haces de células de músculo liso, llamados músculos erectores del pelo, surgen desde la porción superficial de la dermis hasta un lado del folículo piloso. Las terminaciones nerviosas autonómicas hacen que se contraigan los músculos erectores, lo cual empuja los tallos pilosos hasta quedar perpendiculares a la superficie cutánea.<sup>15</sup>

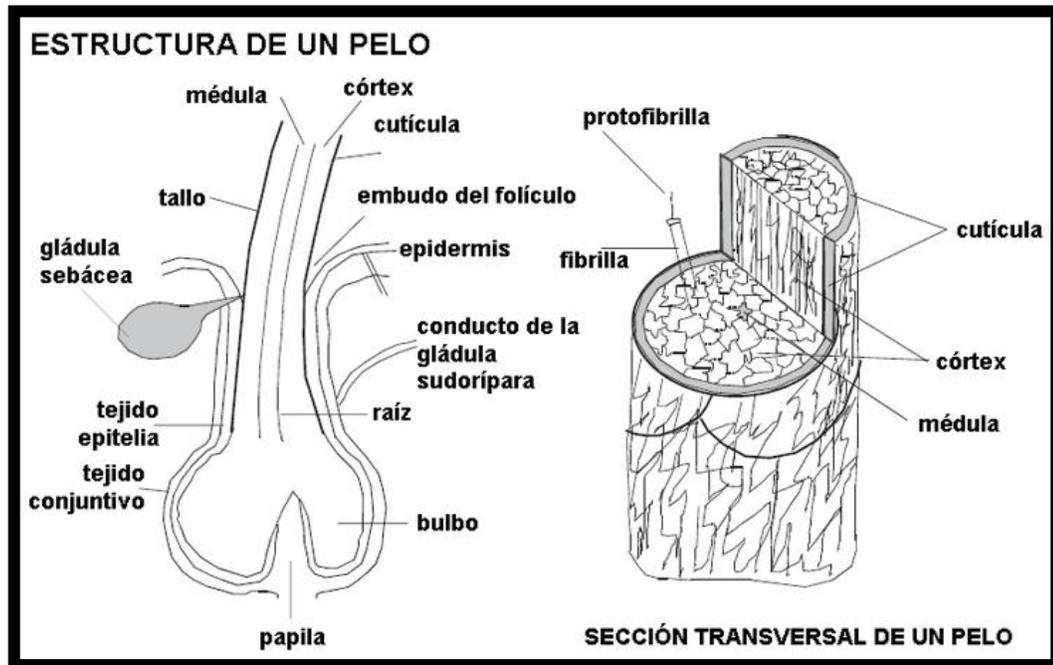


Figura 1. Estructura del Pelo.

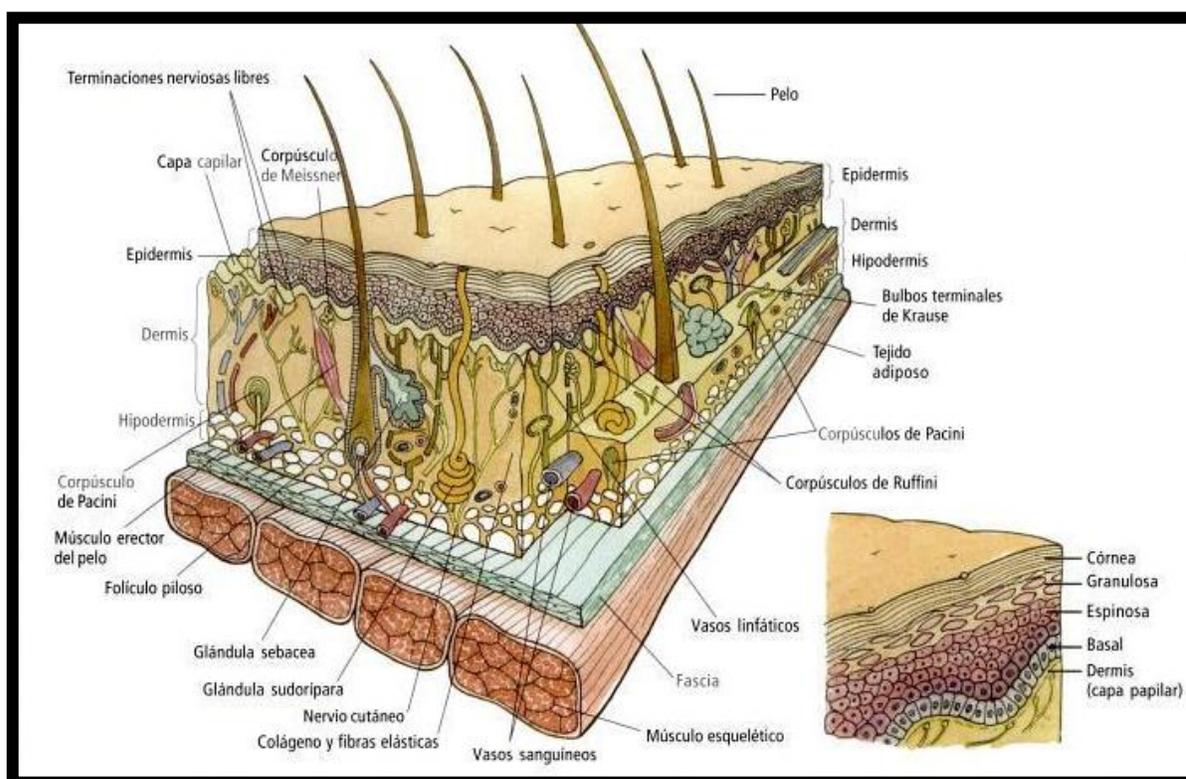
( [www.picstopin.com](http://www.picstopin.com)).

## 6.2. La Piel.

La piel es una membrana dura, flexible e impermeable que recubre el cuerpo. Es el órgano más grande del cuerpo y no solo proporciona una cobertura superficial, sino que también es un órgano sensorial dotado de múltiples terminaciones nerviosas que le confieren sensibilidad al tacto y a la presión, a los cambios de temperatura y a los estímulos dolorosos<sup>6</sup>. Además de ello, protege a los tejidos y órganos subyacentes; excreta sales, agua y residuos orgánicos; y almacena nutrientes <sup>7</sup>. La piel está formada por dos capas: la epidermis y la dermis; la epidermis es la capa externa de la piel, está compuesta por cinco subcapas, estas capas de adentro hacia afuera reciben el nombre de estrato basal, estrato espinoso, estrato granuloso, estrato lucido y finalmente estrato corneo <sup>6</sup>. El estrato corneo es la principal barrera protectora del cuerpo contra el agua, está compuesta por células muertas llenas de una proteína llamada queratina. El estrato lucido está compuesto por células muertas o apoptósicas, aplanadas, que contienen eleidina; esta capa es muy delgada.

El estrato granuloso es la capa de la piel en la que tiene lugar la queratinización, que es la producción de queratina <sup>7</sup>. Los estratos espinoso y basal suelen denominarse en conjunto zona germinal, por su papel productor de nuevas células que reemplazan a las que se desechan en la superficie, son las capas más profundas de la epidermis, se ubica directamente encima de la dermis es la capa regenerativa de la epidermis y da origen a todas las demás capas <sup>6</sup>.

La dermis ubicada inmediatamente después de la epidermis contiene la inervación y la irrigación de la piel, así como todas las estructuras accesorias, como folículo piloso, glándulas sebáceas y sudoríparas. Los folículos pilosos están formados por una raíz, que contiene la matriz rodeada por el folículo, y el tallo, que es la parte visible del pelo y puede variar de tamaño, forma y color. Las glándulas sebáceas liberan una secreción cerosa y oleosa en los folículos pilosos llamada sebo, que actúa como lubricante de la piel. Por su parte, las glándulas sudoríparas se encuentran en todo el cuerpo estas se encargan de excretar sudor a la superficie de la piel, como mecanismo de enfriamiento del cuerpo <sup>7</sup>.



**Figura 2. Estructura anatómica de la piel.**  
(Daza, 2007).

### 6.3. Uña.

Las uñas son placas sólidas y endurecidas de células epidérmicas queratinizadas. Estas células forman una cubierta translúcida y sólida sobre la cara dorsal de la porción distal de los dedos. Cada uña consiste en tres partes principalmente: cuerpo ungueal, borde libre, y raíz de la uña. El cuerpo ungueal es la porción visible de la uña que cubre la parte distal del dedo, el borde libre es la parte que se extiende más allá del extremo distal del dedo y la raíz de la uña es la parte proximal oculta bajo el pliegue de piel. La mayor parte del cuerpo ungueal suele tener coloración rosada a causa de la sangre que fluye por los capilares subyacentes, contrario a lo que ocurre en el borde libre, de coloración blanca; bajo este se encuentra una región de estrato córneo también engrosado, el hiponiquio, el cual une la uña con la yema del dedo. El eponiquio o también llamada cutícula, es una banda angosta de estrato córneo cuyas células se adhieren a los bordes lateral y proximal del cuerpo ungueal. El extremo proximal semilunar blanquecino del cuerpo ungueal se denomina lúnula.<sup>15</sup>

El epitelio situado debajo de la raíz de la uña se conoce como matriz o lecho ungueal y sus células se dividen por mitosis para el crecimiento de la uña, el cual dependerá de diversos factores tales como: edad, salud, estado nutricional, ocupación, hábitos (onicofagia) estación, hora y temperatura ambiental.

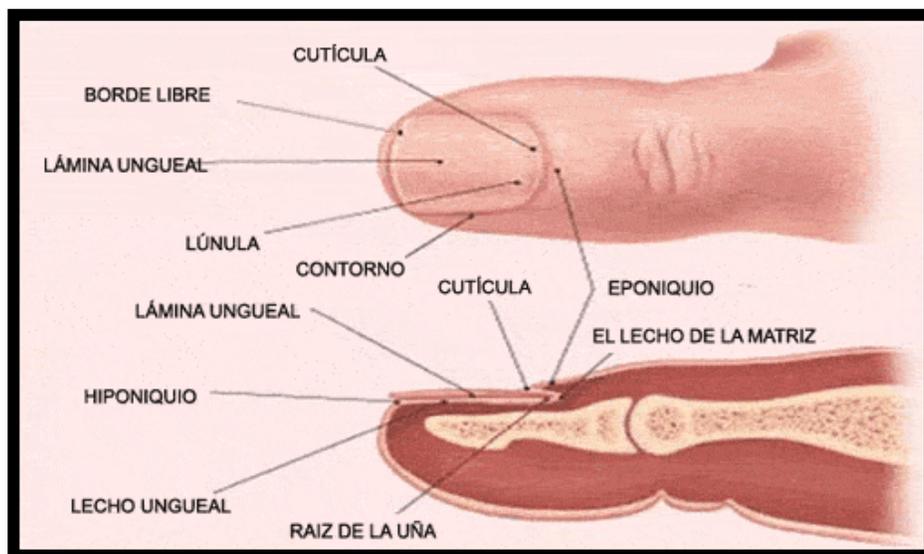


Figura 3. Estructura de la Uña.

( <http://deanatomia.blogspot.mx/2011/04/la-piel-anexos-cutaneos-pelo-y-unas.html> )

## 7. Dermatofitosis

Es importante señalar la diferencia entre los términos dermatomicosis y dermatofitosis; la primera se refiere en modo genérico a las infecciones micóticas de la piel y el segundo se refiere de forma concreta a las micosis cutáneas causadas por un grupo de hongos queratinofilicos denominados dermatofitos.<sup>4</sup>Las dermatofitosis son un conjunto de micosis superficiales que afectan la piel y sus anexos (uñas y pelos), causadas por un grupo de hongos parásitos de la queratina denominados dermatofitos.<sup>47</sup>

## 8. Dermatofitos.

Los dermatofitos son hongos caracterizados por alimentarse de queratina y tener la capacidad patógena superficial para el ser humano.<sup>5</sup> Este grupo de hongos afecta específicamente la epidermis, cabello y uñas<sup>2</sup>, ya que son estructuras muy ricas en queratina. Los dermatofitos poseen una enzima llamada queratinasa<sup>2</sup> la cual les permite degradar la queratina y así diseminarse, es por ellos que también se les denomina queratolíticos. Los dermatofitos se dividen en tres géneros que se distinguen entre ellos por sus características morfológicas, ellos son: *Trichophyton*, *Microsporum* y *Epidermophyton*<sup>1</sup>, basándose en los caracteres de sus macro y microconidias. Aquellos dermatofitos capaces de reproducción sexual se clasifican en el género *Arthroderma*, familia *Arthrodermataceae* de los *Onygenales*, phylum *Ascomycota*<sup>20</sup>.

**Tabla No. 3. Algunas características clínicas de la infección por dermatófitos.**

Enfermedad de la piel	Localización de las lesiones	Aspecto Clínico	Hongos causantes más frecuentes
<b><i>Tinea corporis</i></b> <b>(Tiña del cuerpo)<sup>22</sup></b>	Piel lisa lampiña.	Placas circulares con bordes vesiculados, eritematosas, crecientes y descamación central. Pruriginosa.	<i>Trichophyton rubrum</i> , <i>Epidermophyton floccosum</i> .
<b><i>Tinea pedis</i>*</b> <b>(Tiña de los pies)<sup>24</sup></b>	Espacios interdigitales de los pies en personas que usan zapatos.	Aguda: prurito, vesículas eritematosas. Crónica: prurito, descamación, fisuras.	<i>Trichophyton rubrum</i> , <i>Trichophyton mentagrophytes</i> , <i>Epidermophyton floccosum</i> .
<b><i>Tinea cruris</i></b> <b>(Tiña inguinal)<sup>22</sup></b>	Ingle	Lesión eritematosa descamativa en áreas intertriginosas. Pruriginosa.	<i>T. rubrum</i> , <i>T. mentagrophytes</i> , <i>E. floccosum</i> .
<b><i>Tinea capitis</i></b> <b>(Tiña cabeza)<sup>22</sup></b>	Pelo de la piel cabelluda. Endotrix: hongos dentro del cabello. Ectotrix: hongos en la superficie del cabello.	Placas de alopecia areata con cabellos de tallos cortos o cabellos rotos en los folículos pilosos. Querión de Celso. Pelos fluorescentes por infección con <i>Microsporum</i> .	<i>T. mentagrophytes</i> . <i>Microsporum canis</i> .
<b><i>Tinea barbae</i></b> <b>(Tiña de barba)<sup>22</sup></b>	Vello de la barba.	Lesión eritematosa, edematosa.	<i>T. mentagrophytes</i> ,
<b><i>Tinea unguium</i></b> <b>(Tiña de las uñas)<sup>22</sup></b>	Uña	Uñas distalmente engrosadas o quebradizas; alteraciones del color, deslustradas. Habitualmente acompañada de <i>Tinea pedis</i> .	<i>T. rubrum</i> , <i>T. mentagrophytes</i> , <i>E. floccosum</i> .
<b><i>Dermatofítide</i></b>	Generalmente en caras laterales y superficies flexoras de los dedos. Palmas. Cualquier sitio sobre el cuerpo.	Lesión pruriginosa vesiculosa o bullosa. Más comúnmente acompañada de <i>Tinea pedis</i> .	No se encuentran hongos en la lesión. Puede llegar a infectarse de manera secundaria con bacterias.

\*A veces se acompaña de lesiones en manos y uñas (onicomicosis).

(Brooks. et. al., 2001).

## 9. Clasificación dermatofitos.

Los dermatofitos se clasifican en tres grupos principalmente con base en su hábitat natural y su preferencia por el hospedador. Estos son:

- ▲ **Antropofílicos.** Son los que por lo regular atacan a las personas y de manera excepcional a los animales <sup>47</sup>, se cree que las especies que lo componen evolucionaron de los hongos zoofílicos y que gradualmente perdieron su afinidad por la queratina del animal.<sup>1</sup> Los dermatofitos antropofílicos incluyen el grupo más grande de ataque al hombre y se dividen en tres subgrupos:

  - Dermatófitos antropofílicos cosmopolitas.<sup>47</sup>
  - Dermatófitos que tienen una distribución regional restringida.<sup>47</sup>
  - Dermatófitos antropofílicos estrictos.<sup>47</sup>
  
- ▲ **Zoofílicos.** Son los que atacan por lo regular a los animales<sup>47</sup>, afectan a una gran variedad de aves y mamíferos que actúan como hospedero<sup>1</sup> y, que por el contacto de éstos con el ser humano, pueden infectarlos <sup>47</sup>
  
- ▲ **Geofílicos.** Grupo de dermatofitos que viven en el suelo<sup>1</sup>, y en raras ocasiones atacan a las personas y a los animales <sup>47</sup>. Se presenta en los individuos que están en constante contacto con la tierra <sup>47</sup> ya sea por condiciones de pobreza, vivienda o trabajo.

**Tabla 4. Hábitat de los dermatofitos más frecuentes en México.**

Antropofílico	Zoofílico	Geofílico
<i>Trichophyton rubrum</i> <i>Trichophyton tusurans</i> <i>Trichophyton mentagrophytes</i> <i>var. interdigitale</i> <i>Trichophyton violaceum</i> <i>Trichophyton concentricum</i> <i>Microsporum audouinii</i> <i>Ephidermophyton floccosum</i>	<i>Microsporum canis</i> <i>Microsporum nanum</i> <i>Trichophyton mentagrophytes</i> var. <i>mentagrophytes</i> <i>Microsporum gallinae</i> <i>Trichophyton verrucosum</i> <i>Trichophyton equinum</i>	<i>Microsporum gypseum</i> <i>Trichophyton terrestre</i>

(Bonifaz, 2012).

## 10. Dermatofitosis causada por *Trichophyton mentagrophytes*.

### 10.1. Características Generales.

El género *Trichophyton* se caracteriza por la ausencia parcial de macroconidios<sup>16</sup>, en algunos casos pueden estar presentes o ser favorecida la macroconidiación mediante su cultivo en algunos medios enriquecidos. Los macroconidios son lisos y en forma de clava, sus paredes son finas de 8 a 10 tabiques cuyo tamaño varía de 4 x 8  $\mu\text{m}$  a 8 x 15  $\mu\text{m}$ . Los macroconidios nacen de manera individual en los extremos de las hifas o en conidióforos cortos<sup>17</sup> y cuando se observan tienen forma de lápices con paredes lisas y delgadas<sup>16</sup>. En este género predomina la presencia de microconidias pequeñas, que por lo común son esféricas, piriformes ( en forma de lágrima) o en forma de clava<sup>17</sup>; su tamaño es regular varía entre 1-2  $\mu\text{m}$ , estas se encuentran presentes principalmente en *Trichophyton mentagrophytes*, donde tienden a agruparse en masas que asemejan un racimo de uvas<sup>16</sup>.

*T. mentagrophytes* produce dos formas de colonias: la variedad vellosa que se aísla en casos de tiña de pie y la variedad granular aislada en lesiones adquiridas por contacto con animales infectados. Las colonias de crecimiento rápido pueden ser blancas, algodonosas o vellosas, color crema o amarillo con gránulos gruesos o pulvulentas. Por su parte, las colonias granulares pueden mostrar una pigmentación roja, al reverso de la colonia es común observar una coloración rosa o castaño, y en ocasiones anaranjado o rojo oscuro.<sup>17</sup>

Las colonias vellosas blancas producen pocos microconidios esféricos; las colonias granulares esporulan de modo libre y producen numerosos microconidios pequeños y esféricos en cúmulos similares a racimos de uvas y menos frecuente la presencia de macroconidios esféricos de paredes lisas y delgadas en forma de cigarro, que miden de 6 x 20  $\mu\text{m}$  a 8 x 50  $\mu\text{m}$ , con dos a cinco tabiques. Los macroconidios en caso de estar presentes, muestran una adherencia estrecha definida en su base. La presencia de hifas en forma de espiral es otro elemento que permite diferenciar esta especie de las demás, aunque esta característica solo se puede observar en primo aislamiento y en solo un tercio de los hongos aislados.<sup>17</sup>

## 11. Diagnóstico y Aislamiento

El diagnóstico de una dermatofitosis se basa en la historia clínica, examen clínico y demostrar la infección fúngica con uno, o más, de los métodos complementarios<sup>23</sup>. El diagnóstico oportuno, además de preciso; constituye una herramienta de suma importancia ya que permite que el Médico señale un adecuado tratamiento y el tiempo de recuperación de la afección del paciente se vea reducido.

En primera instancia se recomienda realizar un examen directo; las escamas de piel, raspados de uñas y pelos, estos deben examinarse con KOH al 10% haciendo emulsionar la muestra clínica en una gota de este agente sobre un portaobjetos. El propósito del KOH es aclarar cualquier escama del fondo o membranas celulares que puedan confundirse con elementos de las hifas<sup>16</sup>, una vez montada la muestra se deja reposar por 15 ó 20 minutos y finalmente se observa al microscopio<sup>11</sup>.

Para complementar la prueba microscópica del examen directo, se realizan las pruebas de ureasa y del señuelo. La prueba del señuelo con pelos se realiza colocando un mechón de pelos en una caja Petri que contiene agua. A continuación, el agua se inocula con una porción de la colonia a identificar. *T. mentagrophytes* invadirá el tallo del pelo dentro de los 7 a 10 días, y provocará agujeros de forma cónica<sup>16</sup>; este dermatofito produce ureasa dentro de los 2 a 3 días posteriores a la inoculación en caldo urea de Christensen<sup>17</sup> virando el medio a un color rosado rojo por acción del indicador rojo de fenol presente en el medio al alcalinizarse este <sup>24</sup>.

Los medios rutinarios para el primo aislamiento de dermatofitos son: agar dextrosa Saboraud y agar Saboraud complementado con antibióticos, esto último con la finalidad de prevenir el crecimiento de hongos saprobios o bacterias. Las colonias se desarrollan en un periodo promedio de 10 a 15 días, incubadas a una temperatura de 25 a 28°C<sup>11</sup>. Los dermatofitos se identifican basándose en la apariencia y color de la colonia, debido a la pigmentación del medio (el cual puede apreciarse al reverso de la caja Petri); y en la observación macroscópica de los macroconidios<sup>25</sup>.

De igual manera se emplea el DTM (*Dermatophyte Test Medium*) como medio de crecimiento para el diagnóstico de dermatofitosis. El DTM es agar Dextrosa de Saboraud adicionado con antibióticos generalmente cloranfenicol y un fungistático que inhibe el crecimiento de hongos saprofitos<sup>25</sup>, junto con rojo de fenol como indicador. Los dermatofitos metabolizan primero la proteína del medio, lo que produce metabolitos alcalinos que cambian el color del indicador de pH a rojo. Esto debe producirse durante los primeros 10 días cuando crece la colonia de hongos<sup>26</sup> a 25°C.

La identificación fúngica macroscópica presta especial interés a la textura, pigmento y velocidad de crecimiento de la colonia. La identificación microscópica debe hacerse en cultivos jóvenes, ya que los dermatofitos en los cultivos, a medida que van envejeciendo, sufren un proceso llamado pleomorfismo<sup>27</sup>.

El diagnóstico histopatológico para la dermatofitosis es difícil, ya que los cambios morfológicos son mínimos, y el único hallazgo es el engrosamiento del estrato córneo (Hiperqueratosis) <sup>11</sup>; por lo que el empleo de tinciones especiales como PAS (Ácido Peryódico de Schiff), puede demostrar la presencia de hifas y artroconidios<sup>25</sup>.

## **12. Tratamiento.**

Las dermatofitosis suelen ser enfermedades crónicas y de difícil tratamiento, por lo que representan para el clínico las enfermedades fúngicas superficiales de terapéutica más difícil y de mayor problemática <sup>25</sup>. Para el tratamiento de las dermatofitosis se cuenta con productos de aplicación tópica en las lesiones, como los queratolíticos o fungistáticos. También se recurre al tratamiento sistémico <sup>29</sup>, siendo necesario cuando se encuentra infectado el pelo o las uñas porque los fungicidas aplicados de forma local no penetran en la matriz hística donde reside el hongo<sup>28</sup>. El tipo de manejo y el producto a utilizar se deben definir en cada caso, en función de la micosis de la cual se trate, la localización y la extensión de las lesiones, así como las características del paciente, como el estado inmunológico, entre otros aspectos <sup>29</sup>.

Entre los productos principales con los que se cuenta para el tratamiento de las micosis superficiales producidas por dermatofitos tenemos: la tintura de yodo, ácido benzoico, ácido undecilénico, miconazol, tonalftato, griseofulvina, ketoconazol, itraconazol, tolciclato, fluconazol, naftifine y terbinafina<sup>29</sup>.

Anteriormente el tratamiento local se basaba en el uso de agentes queratolíticos como el ácido undecilénico y ácido salicílico; además del empleo de la tintura de yodo y aunque presentaban una exitosa mejoría en lesiones dérmicas de corta evolución y localizadas, hoy en día la aparición de cremas, ungüentos y lociones (Ver Tabla No.3) a base de tolnaftato y de derivados del imidazol (econazol, clotrimazol, miconazol, ketoconazol, isoconazol, itraconazol), de morfolinás (amorolfina y de las alilaminas (naftifina y terbinafina); han permitido controlar adecuadamente la mayoría de las tineas siempre que no se trate de formas extensivas o crónicas<sup>30</sup>. En las lesiones relativamente pequeñas de las dermatofitosis se puede efectuar el tratamiento tópico con agentes como clotrimazol, miconazol, econazol, isoconazol, bifonazol, tioconazol, ketoconazol, terbinafina, amorrojfina o ciclopiroxolamina en crema o lociones<sup>31</sup>.

Por otra parte, los antifúngicos orales están indicados para el tratamiento de áreas hiperqueratósicas (uñas, palmas y lantás), tinea capitis, pacientes con infección crónica, lesiones extensas, intolerancia, lesiones granulomatosas, pacientes inmunodeprimidos y el tratamientos sistémicos cuyo tratamiento previo con los antifúngicos tópicos no haya presentado resultados favorables<sup>20</sup>.

**Tabla No. 5. Antifúngicos tópicos.**

<b>Imidazoles y derivados</b>	<b>Morfolinas</b>	<b>Allilaminas</b>	<b>Miscelánea</b>
Bifonazol	Amorolfinas	Naftifina	Ác. Benzoico/ácido salicílico (ungüento de Whitfield)
Butoconazol		Terbinafina	Ciclopirox
Butenafina			Glutaraldehido
Clotrimazol			Griseofulvina
Croconazol			Haloprogina
Eberconazol			Tertienil derivados
Fenticonazol			Tertiofeno derivados
Flutrimazol			Tolnaftato
Isoconazol			Ácido undecilénico
Ketoconazol			
Miconazol			
Omoconazol			
Oxiconazol			
Sertaconazol			
Sulconazol			
Terconazol			
Tioconazol			

(Rubio .et. al., 1999).

Entre los principales antifúngicos orales se encuentran:

▲ **Griseofulvina.**

Se ha utilizado desde 1958 para el tratamiento de la infección por dermatofitos. La griseofulvina es fungistática *In vitro* y tiene un espectro estrecho de actividad antimicótica<sup>32</sup>; su mecanismo de acción radica en que esta se deposita debajo de la epidermis, formando una barrera que impide que el dermatofito alcance la queratina<sup>30</sup> e interrumpe la formación de los microtúbulos del huso mitótico, produciendo así la detención de la mitosis en la metafase<sup>32</sup>. Este antifúngico tiene un espectro de cobertura limitado en comparación con otros agentes y se requieren tratamientos más prolongados, no se utiliza como terapia de primera línea, excepto para la tiña de la cabeza<sup>32</sup>. Los efectos adversos más llamativos son: fotosensibilidad, urticaria, problemas digestivos, fatiga y leucopenia (raro). La respuesta al tratamiento depende del grado de queratinización y del tiempo necesario para la descamación de las estructuras queratinizadas infectadas<sup>20</sup>.

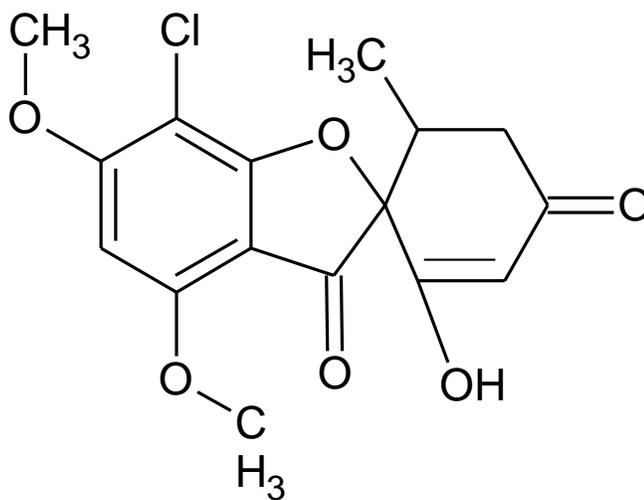


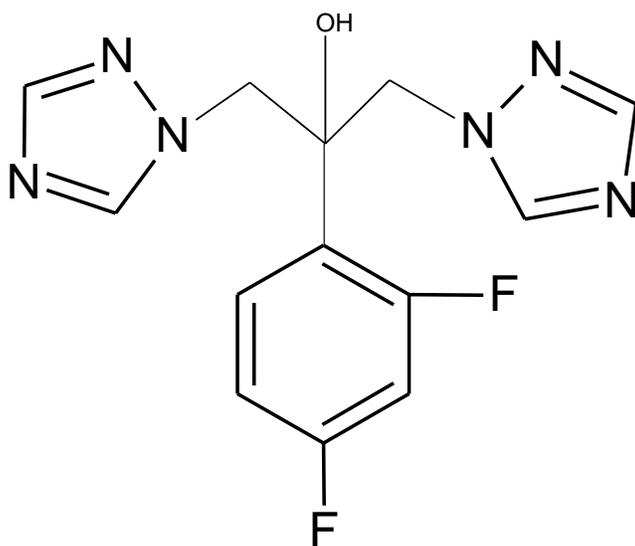
Figura 4. Estructura Química de la Griseofulvina.

(Klaw. et. al., 2009).

### ▲ **Fluconazol.**

El fluconazol es un bistriazol<sup>33</sup> con actividad fungistática *in vitro* es eficaz contra muchas levaduras (excepto *Candida krusei*) y dermatofitos<sup>32</sup>. Este antifúngico al igual que el itraconazol actúa inhibiendo la síntesis de ergosterol mediante la inhibición de la enzima 14 $\alpha$ -lanosterol-desmetilasa<sup>3</sup>, una enzima del Citocromo P<sub>450</sub> microsomal, en la membrana del hongo<sup>32</sup>. Está indicado principalmente para el tratamiento de candidiasis mucocutáneas, candidiasis diseminada, infecciones criptocócicas, micosis endémicas y dermatomicosis, en esta última afección se encuentran: *tinea pedis*, *tinea corporis*, *tinea cruris*, *tinea unguium* y pitiriasis versicolor<sup>33</sup>. Además debido a su capacidad de difundir al líquido cefalorraquídeo lo distingue de otros agentes antimicóticos, siendo el tratamiento ideal para la meningitis por criptococos<sup>32</sup>.

Los principales efectos adversos son gastrointestinales, cutáneos, hepáticos, y es muy importante tener en cuenta su gran número de interacciones farmacológicas<sup>34</sup>.



**Figura 5. Estructura Química del Fluconazol.**

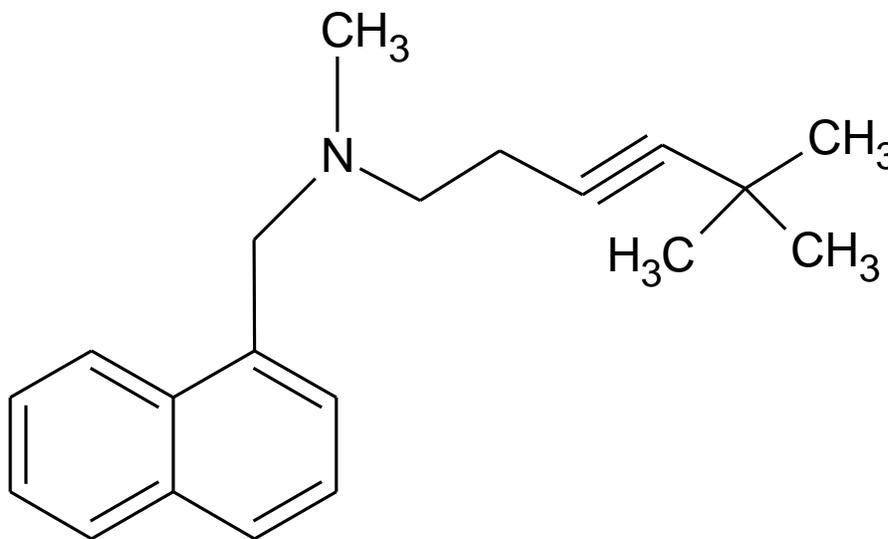
(Klaw. et. al., 2009).

### ▲ **Terbinafina.**

El clorhidrato de terbinafina es un agente antimicótico que pertenece a la familia de sustancias químicas conocidas como *alilaminas*. Todos los derivados de este grupo poseen una alilamina terciaria, para la actividad antimicótica. *In vitro*, el fármaco es principalmente un agente fungicida, y es muy activo frente a dermatofitos (siendo el tratamiento de elección en *tinea unguium* y *tinea capitis*<sup>20</sup>), aunque menos frente a mohos, hongos dimórficos y varias levaduras<sup>32</sup>.

La terbinafina inhibe a la enzima escualeno epoxidasa de la membrana celular del hongo, bloqueando así la biosíntesis de ergosterol. La escualeno epoxidasa, una enzima microsomal compleja no pertenece al Citocromo P<sub>450</sub>, cataliza el primer paso en la síntesis del ergosterol: la conversión de escualeno en epóxido. En consecuencia se produce una acumulación intracelular anormal de escualeno, y una deficiencia de ergosterol. *In vitro* la acumulación de escualeno es la causa de la actividad fungicida del medicamento, ya que produce la rotura de la membrana por el depósito de vesículas lipídicas al acumularse este compuesto<sup>20</sup>; mientras que la deficiencia de ergosterol se asocia con su actividad fungistática<sup>32</sup>.

Dada su alta selectividad, la terbinafina suele ser bien tolerada, con una baja incidencia de efectos adversos. Los efectos colaterales más comunes de la administración oral son digestivos<sup>32</sup>.



**Figura 6. Estructura Química de la Terbinafina.**

(Klaw. et. al. ,2009).

De igual manera, se recomienda el cuidadosos aseo personal como una medida indispensable para la recuperación. Tampoco debe descartarse el papel jugado por otros microorganismos, cuya curación depende del tratamiento antibacteriano combinado. Algunas dermatofitosis pueden prevenirse media ante simples medidas higienicas tales como: no usar ropas, peines o zapatos provenientes de otras personas; abstenerse de contactos con posibles animales portadores; evitar la excesiva humedad y el roce producido por prendas inadecuadas, algunas veces se recomienda el uso preventivo de talcos con sustancias antimicóticas en medias y zapatos<sup>30</sup>.

## Objetivo General

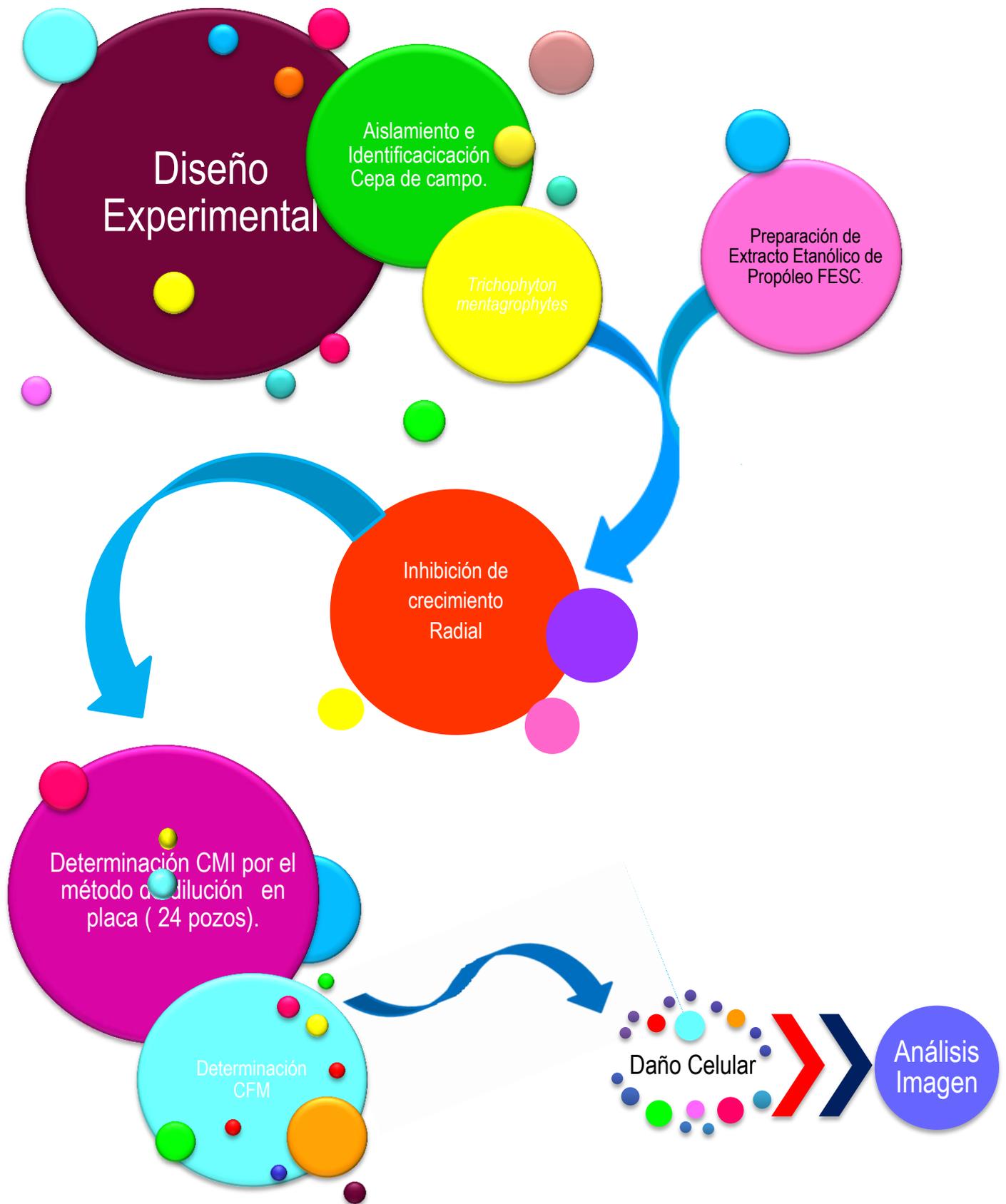
Estudiar la actividad antimicótica *in vitro* del propóleo sobre *Trichophyton mentagrophytes*, a partir del empleo de pruebas cualitativas, así como cuantitativas; que nos permitirán evaluar el daño celular producido por el propóleo sobre el hongo.

## Objetivos Particulares

- 1) Determinar de forma cualitativa, si el propóleo afecta el crecimiento de *Trichophyton mentagrophytes* mediante el empleo de la prueba de inhibición de crecimiento radial.
- 2) Determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) del propóleo sobre *Trichophyton mentagrophytes*, por medio del método de dilución en placa de 24 pozos.
- 3) Determinar la concentración fungicida mínima (CFM) del propóleo sobre *Trichophyton mentagrophytes*, mediante la prueba de daño celular descrita por Londoño en placas de agar SDA.
- 4) Evaluar el daño celular causado por el extracto etanólico del propóleo sobre *T. mentagrophytes* mediante el empleo de las técnicas de Microscopia Óptica y Análisis de Imagen, para evidenciar el daño producido sobre este hongo.

## Hipótesis

Al poseer el propóleo actividad fungicida, fungistático y efecto sobre la estructura celular, deberá inhibir el crecimiento del hongo *Trichophyton mentagrophytes* y evidenciar daño celular al ser analizado.



## **Materiales y Métodos**

### **1. Extracto Etanólico de Propóleo.**

El extracto etanólico de propóleo (EEP) fue donado por el Laboratorio de Química Orgánica L121, en donde se llevó a cabo el procesamiento del propóleo en bruto o también llamado greña procedente del Apiario de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán: Campo 4, UNAM recolectado en el mes de octubre del 2011. Una vez recolectado se procedió a realizar la limpieza de este, para eliminar trozos de madera, cadáveres de abejas u otros insectos, piedras, ceras. Después se cortó en pequeños pedazos, pesando 100 g; esta cantidad fue colocada en un frasco color ámbar al cual se le añadieron previamente 300 mL de alcohol absoluto. Esta preparación se dejó macerar durante un periodo de 10 días en agitación frecuente. Transcurrido el tiempo de maceración, se decantó y filtro la preparación; el extracto obtenido se llevó a destilación en un rotavapor (Büchi R-205 B-490) a 85 revoluciones de rotación, 27°C de temperatura de vapor y una temperatura de baño de 55°C. El producto obtenido: extracto etanólico (EEP), posteriormente se llevó a sequedad por evaporación en una campana de vacío por un periodo de 24 días, se pesó y envaso en un frasco de vidrio color ámbar, almacenándolo a temperatura ambiente y protegido de la luz a temperatura ambiente, hasta su utilización.

### **2. Microorganismo.**

La cepa de *Trichophyton mentagrophytes* empleada fue aislada de un caso clínico de dermatofitosis humana; correspondiente a una paciente del sexo femenino de 49 años de edad, la cual presentaba ennegrecimiento de la uña del dedo pequeño en el pie derecho. Se tomó una muestra del raspado de uña, y se analizó por Observación Directa con KOH 15%; observando la presencia de esporas, por lo que se prosiguió a realizar el primo aislamiento en Agar Micobiotic®. Una vez transcurrido el tiempo de crecimiento, las características coloniales observadas presuntivamente correspondientes a *Trichophyton mentagrophytes* con base en lo referido en la literatura. De igual manera, se realizó la Tinción de Azul de Algodón observando la presencia de hifas helicoidales características de este microorganismo.

Así mismo se realizó la prueba de Urea de Rustigian y Stuart para confirmar la identidad de este microorganismo de otras especies del mismo género, puesto que *Trichophyton mentagrophytes* posee la capacidad de hidrolizar la urea del medio a diferencia de las otras. Se inoculó un tubo y se llevó a incubación durante 2 a 3 días a una temperatura de 25°C, junto con un tubo control.

### **3. Prueba de Inhibición de crecimiento radial (Método modificado de Ye, 1999 y Wang y Bun 2002).**

La cepa obtenida de *Trichophyton mentagrophytes* fue sembrada en el medio de cultivo Agar Dextrosa-Papa (ADP, DIBICO) llevando a una temperatura de incubación de 25°C por un periodo de 7 a 10 días, hasta observar el desarrollo colonial de este dermatofito.

Se cortaron discos de 5 mm de diámetro de papel Whatman No. 5, se llevaron a esterilizar en autoclave para posteriormente impregnarlos con el EEP. Para lo cual, se prepararon 2 soluciones stock: la primera de 10 mg/50 µL y la segunda de 60 mg/150 µL, empleando como solvente una solución de etanol al 70%. A partir de estas soluciones stock se tomó la cantidad correspondiente para obtener las concentraciones de 2, 4 y 8

mg, impregnando así los discos a emplear con el EEP; para el control se impregno con 10  $\mu$ L de etanol al 70%, puesto que fue el solvente empleado para las soluciones stock.

Una vez que la cepa estuvo lista, se prosiguió a colocar en el centro de una caja Petri (100x15) cuyo contenido era de 20 mL de ADP, un inóculo de 5 mm de diámetro de *Trichophyton mentagrophytes*; una vez realizado se procedió a colocar alrededor del inóculo, a una distancia de 30 mm del límite micelial los discos impregnados con el EEP a las concentraciones mencionadas anteriormente, colocadas en el siguiente orden: control, 2 mg, 4 mg y 8 mg. Las placas fueron llevadas a incubación a una temperatura de 25°C hasta que la superficie del agar fuese cubierta por el micelio, y fuese posible observar la formación de halos de inhibición en formas de medias lunas.<sup>10, 11, 12.</sup>

#### **4. Determinación de concentración mínima inhibitoria (MIC) por el método de dilución en placa de 24 pozos (Londoño, 2010).**

Para la realización de esta prueba se emplearon placas de 24 pozos de fondo plano (EVERGREEN), en primera instancia procedió la preparación de una solución patrón de EEP tomando 60 mg de propóleo y llevándolo a un volumen final de 300  $\mu$ L con Etanol al 70%. Las concentraciones a evaluar del extracto de propóleo fueron las siguientes: 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 mg/mL; para ello se preparó en tubos de vidrio Agar SDA con 4 mL de medio en cada uno (esto debido a que cada concentración se realizó por triplicado y se consideró 1 mL extra por cualquier contratiempo) y se llevó a esterilizar en autoclave. Posteriormente con ayuda de una micropipeta se retiró la cantidad de medio correspondiente a la cantidad de solución patrón a añadir, adicionando a cada pozo 1 mL del medio con cada una de las concentraciones del extracto descritas por triplicado, como se mencionó con anterioridad. Una vez vertido el medio se dejó solidificar y la placa se dispuso por 24 horas a control de esterilidad. Dicho lo anterior se prosiguió a colocar en el centro de cada pozo un fragmento del cultivo de *Trichophyton mentagrophytes* de 1 mm de diámetro, empleando como control el medio sin extracto. Finalmente una vez inoculada la placa, se llevó a incubación a una temperatura de 25°C, hasta observar crecimiento en los pozos control, lo que a su vez permitió medir el área de crecimiento micelial, al igual que la concentración mínima inhibitoria.<sup>13</sup>

#### **5. Daño Celular (Modificado de Londoño, 2010).**

Para la evaluación del daño celular de la Cepa de *Trichophyton mentagrophytes* se inocularon 4 cajas grandes de agar Borelli (ya que este medio favorece la microconidiación al ser un medio altamente rico), y se llevaron a incubación a una temperatura de 28°C hasta observar que el micelio cubría el medio en su totalidad. Posterior a ello, se realizó la cosecha del microorganismo empleando solución salina estéril al 85%, previamente esterilizada, de la cual se añadieron 3 mL a cada caja y con ayuda del asa micológica se desprendió suavemente el micelio. El sobrenadante obtenido se colectó con una micropipeta y se colocó en un tubo estéril, una vez obtenido el sobrenadante de las 4 cajas se homogenizó perfectamente con ayuda del vórtex (Agitador vórtex Genie-2) y se igualo al Tubo No. 0.5 del Nefelómetro de McFarland.

Las concentraciones a evaluar se dispusieron de la siguiente manera: Control, 0.25, 0.5, 1.0 y 1.5 mg/mL, de esta manera se colocó un 1 mL del sobrenadante que contiene al hongo previamente estandarizado en un tubo Eppendorf para cada concentración. A su vez, se preparó una solución "Stock" cuyo contenido era de 4 mg de propóleo en 80  $\mu$ L de Etanol al 70%, de la cual se añadió a cada tubo Eppendorf la cantidad correspondiente a la concentración requerida. Previo a esto, se retiró la cantidad de sobrenadante

correspondiente al volumen que se adicionaría de stock, para que el volumen final fuese 1 mL. Una vez finalizado, se homogenizó en el vórtex y se llevó a incubar por 24 horas a una temperatura de 25°C. Transcurridas las 24 horas, se retiraron las preparaciones de incubación y se homogenizaron nuevamente. Se realizaron observaciones de cada una de las concentraciones, colocando 10 µL de cada preparación en un portaobjetos, al mismo tiempo se añadió azul de algodón para teñir las estructuras, permitiendo así su contraste. Todas las preparaciones fueron observadas y analizadas en un microscopio (Carl Zeiss, Axioscop 40) acoplado a una cámara Evolutio VF Cooled Color Media Cybernetics.

Las imágenes obtenidas, fueron analizadas con ayuda del Software Q Capture Pro 6.0; por medio del cual se llevaron a cabo las observaciones detalladas de las características microscópicas de *Trichophyton mentagrophytes* al exponerse a las concentraciones del EEP empleadas. Permitiendo de esta manera, realizar las mediciones pertinentes del diámetro de las hifas y macroconidios.

Los resultados obtenidos, se capturaron y analizaron mediante el Método Estadístico de ANOVA, con ayuda del programa Graph Pad Prism Versión 6.

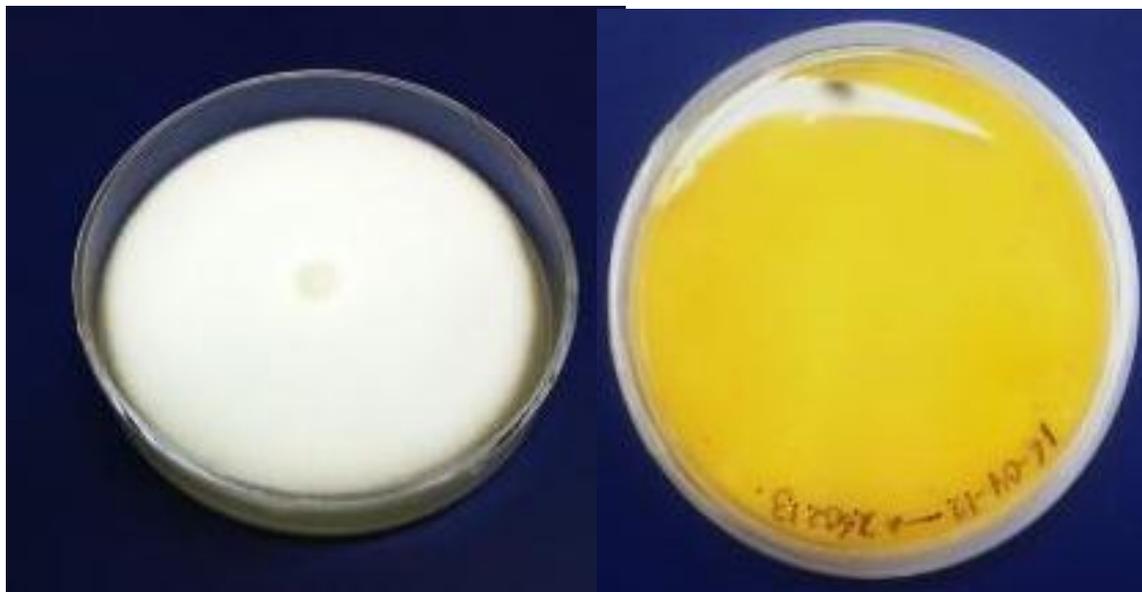
#### **6. Determinación de la Concentración Fungicida Mínima (CFM) del extracto etanólico de propóleo (EEP) para *Trichophyton mentagrophytes* (Modificado de Soares, 2001).**

Esta prueba se realizó de forma simultánea a la de daño celular, empleando la misma cosecha del hongo, así como la misma solución stock; efectivamente, al momento de colocar cada una de las preparaciones tratadas con el EEP en el portaobjetos, de manera paralela se tomaban 10 µL de la preparación y se colocaron al centro de pequeñas placas Petri de agar SDA. Cada concentración se inoculó en placas individuales y se llevó a incubar a 25°C hasta los 7 días, tiempo al cual se realizaron las mediciones pertinentes a las colonias desarrolladas.

## Resultados

### Identificación *Trichophyton mentagrophytes*.

La cepa aislada de *Trichophyton mentagrophytes* se sembró en Agar Borelli para favorecer la conidiación al ser un medio altamente rico. Las colonias desarrolladas son algodonosas y en la parte posterior de la caja Petri, se puede apreciar el pigmento amarillo característico de los cultivos jóvenes<sup>17</sup> (Ver Figura 7).



**Figura 7. Desarrollo colonial de *T.mentagrophytes* en Agar Borelli (se puede apreciar el desarrollo de colonias algodonosas, color blanco y se puede apreciar el desarrollo de un pigmento amarillo al reverso de la caja). (Martínez, 2013.)**

De forma paralela, se montó la prueba de microcultivo para observar las estructuras microscópicas del hongo transcurridos los 7 días de incubación; y mediante la técnica de tinción con azul de algodón, se realizaron las observaciones de las estructuras microscópicas del hongo, en las que pudimos observar la presencia de hifas en espiral características de esta especie, además de abundantes microconidios redondos agrupados en racimos (Figuras 8 y 9).

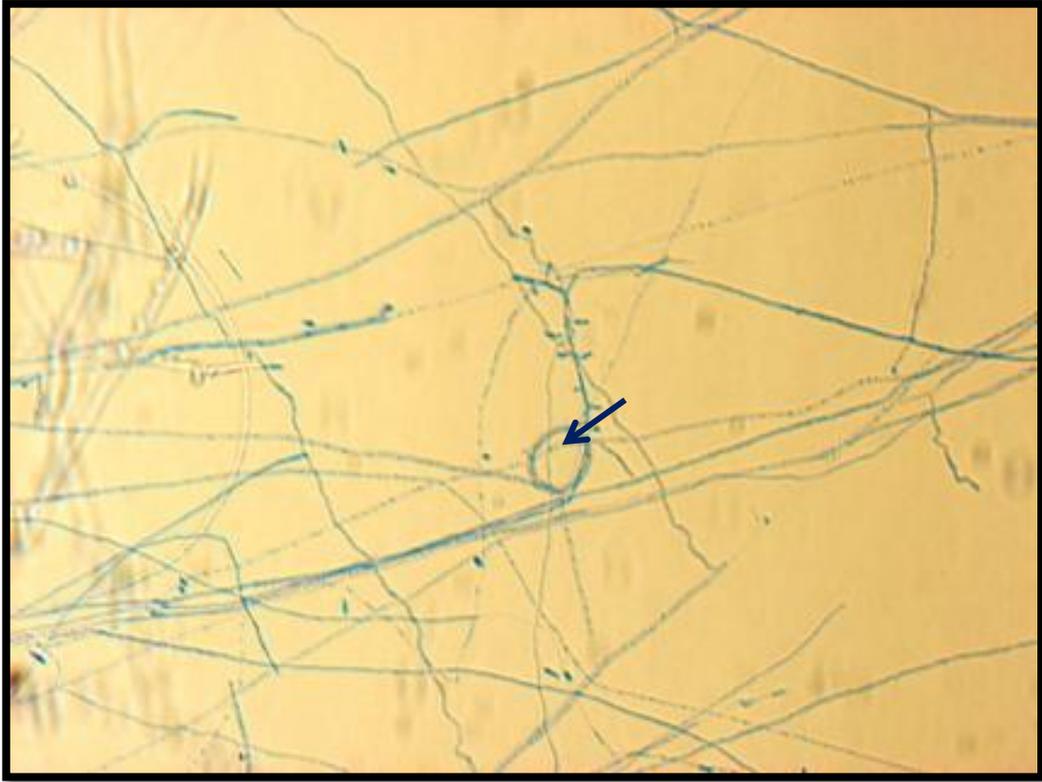


Figura 8. *Trichophyton mentagrophytes*, presencia de hifas en espiral (prueba de microcultivo: ella se aprecia la presencia de hifas en espiral características de *T. mentagrophytes* observadas al microscopio en Objetivo 40x, mediante la Tinción de Azul de Algodón).  
(Martínez, 2013).

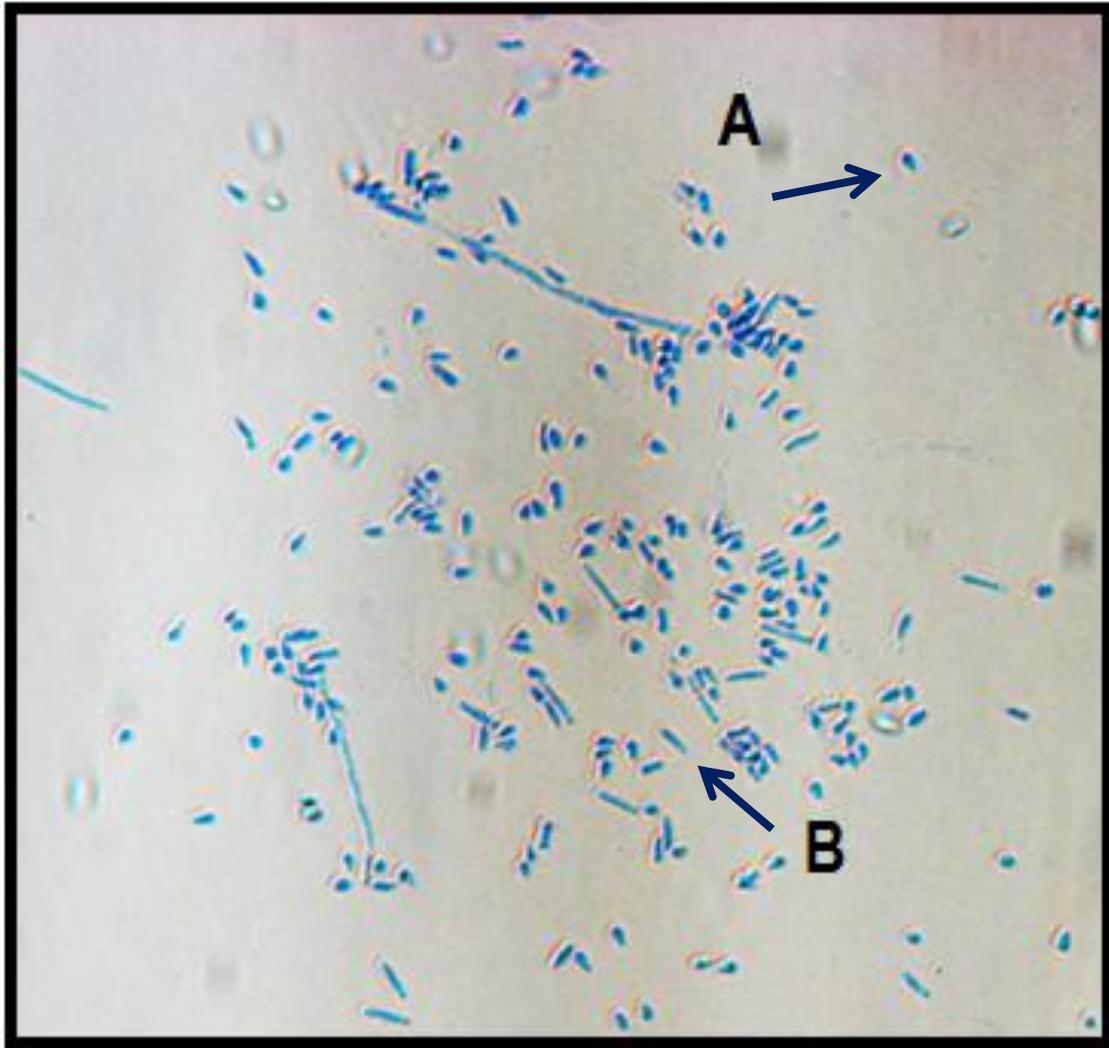


Figura 9. Tinción de Azul de algodón (nótese la presencia de abundantes microconidios en forma de lágrima<sup>17</sup> (A), así como macroconidios en forma de lápices<sup>17</sup> (B)).  
(Martínez. 2013).

Se realizó la prueba de Urea de Rustigian y Stuart para el diagnóstico y diferenciación de la Cepa de *T. mentagrophytes*, ya que esta especie tiene la capacidad de virar el medio a en 1 a 2 días (Ver Figura 10).

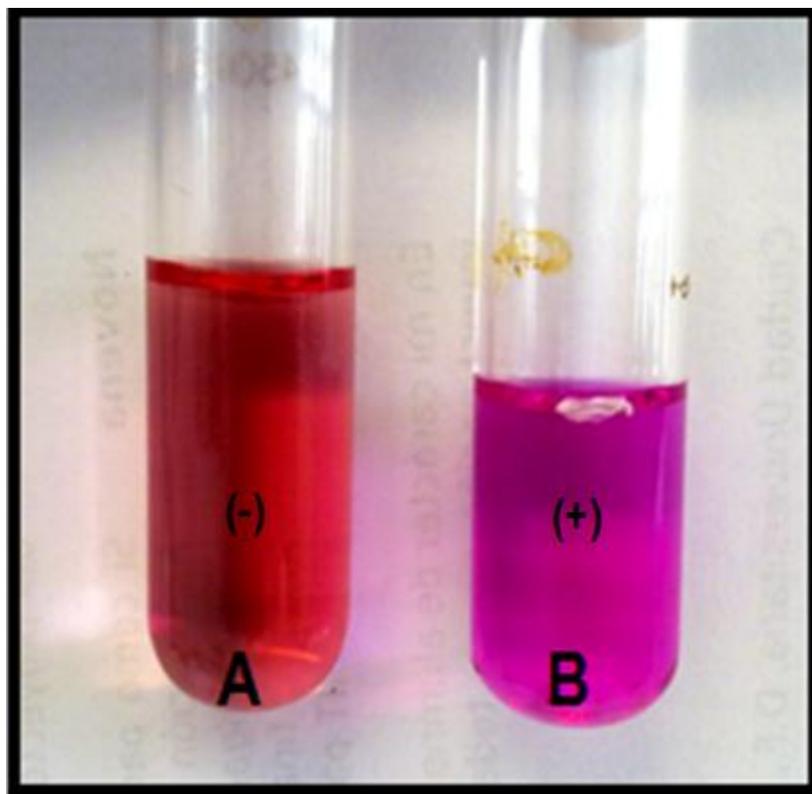
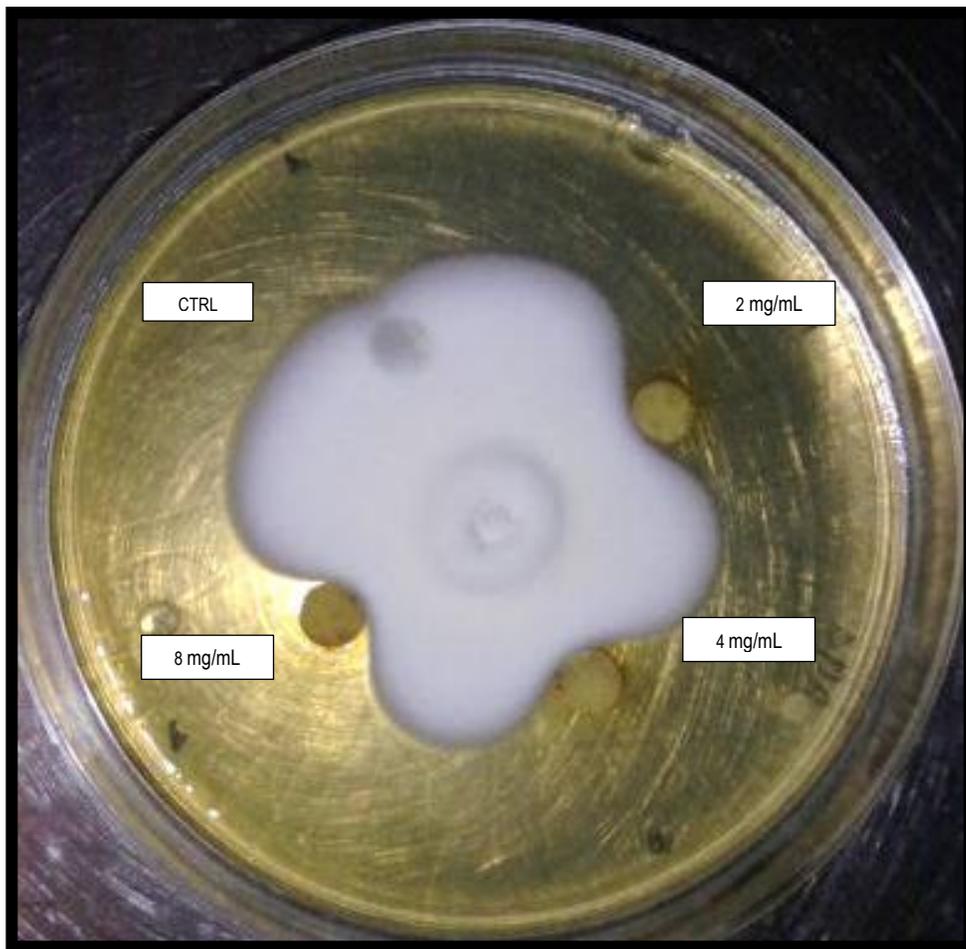


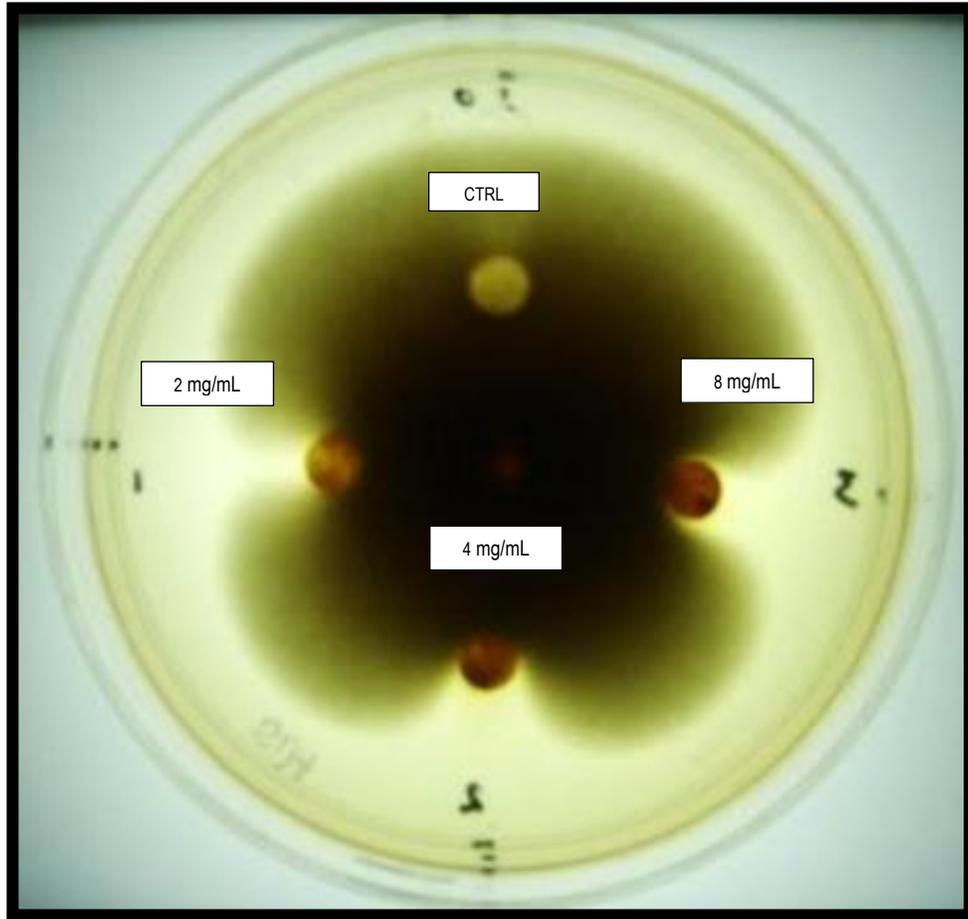
Figura 10. Urea de Rustigian y Stuart para *T.mentagrophytes*. (El tubo A corresponde al control y el tubo B al tubo inoculado, nótese la diferencia entre la coloración carmín del tubo A y el cambio a rosado rojo como resultado de una prueba positiva para Urea, posterior a los 3 días de incubación). (Martínez, 2013).

### Prueba Inhibición Crecimiento Radial.

Las placas inoculadas con *T. mentagrophytes* se incubaron hasta observar la aparición de las medias lunas o depresiones de las 3 concentraciones empleadas: control (Etanol 70%), 2 mg/mL, 4 mg/mL y 8 mg/mL. Los resultados obtenidos mostraron que las 3 concentraciones hacen presentar inhibición del crecimiento del hongo, siendo la más representativa la de 8 mg/mL.

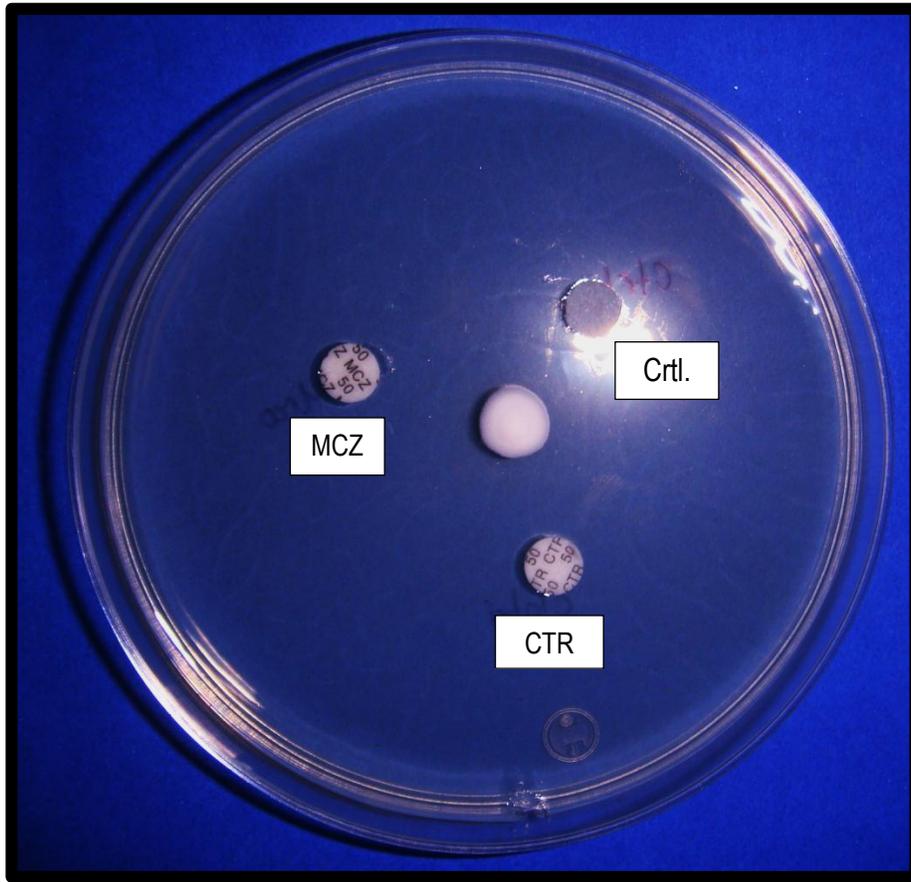


**Figura 11. Inhibición Crecimiento Radial a los 7 días de incubación (Se puede observar la inhibición del crecimiento del hongo a las 3 diferentes concentraciones empleadas, contrario a lo que sucede con el control, en que podemos notar que el Etanol no presenta efecto inhibitorio sobre el hongo, caracterizado por una depresión o media luna).  
(Martínez, 2013).**



**Figura 12. Inhibición Crecimiento Radial 10-12 días de incubación. (En esta imagen se aprecia de manera más clara la inhibición en las 3 concentraciones empleadas de EEP, posterior al tiempo de incubación).  
(Martínez, 2013).**

De manera paralela, se realizó la evaluación de la sensibilidad de *Trichophyton mentagrophytes* frente a 4 diferentes antifúngicos: Clotrimazol (CTR), Voriconazol (VCZ), Ketoconazol (KET) y Miconazol (MCZ), que como se puede apreciar en las Figuras 13 y 14. El microorganismo presenta sensibilidad a los 4 antifúngicos al verse inhibido en su totalidad.



**Figura 13. Sensibilidad del *Trichophyton mentagrophytes* frente a antifúngicos. (Resultados obtenidos ante los 2 diferentes antifúngicos a los que se enfrentó el hongo: Control: etanol 70%, Clotrimazol: 50  $\mu$ g, y Miconazol: 50  $\mu$ g). (Martínez, 2013).**

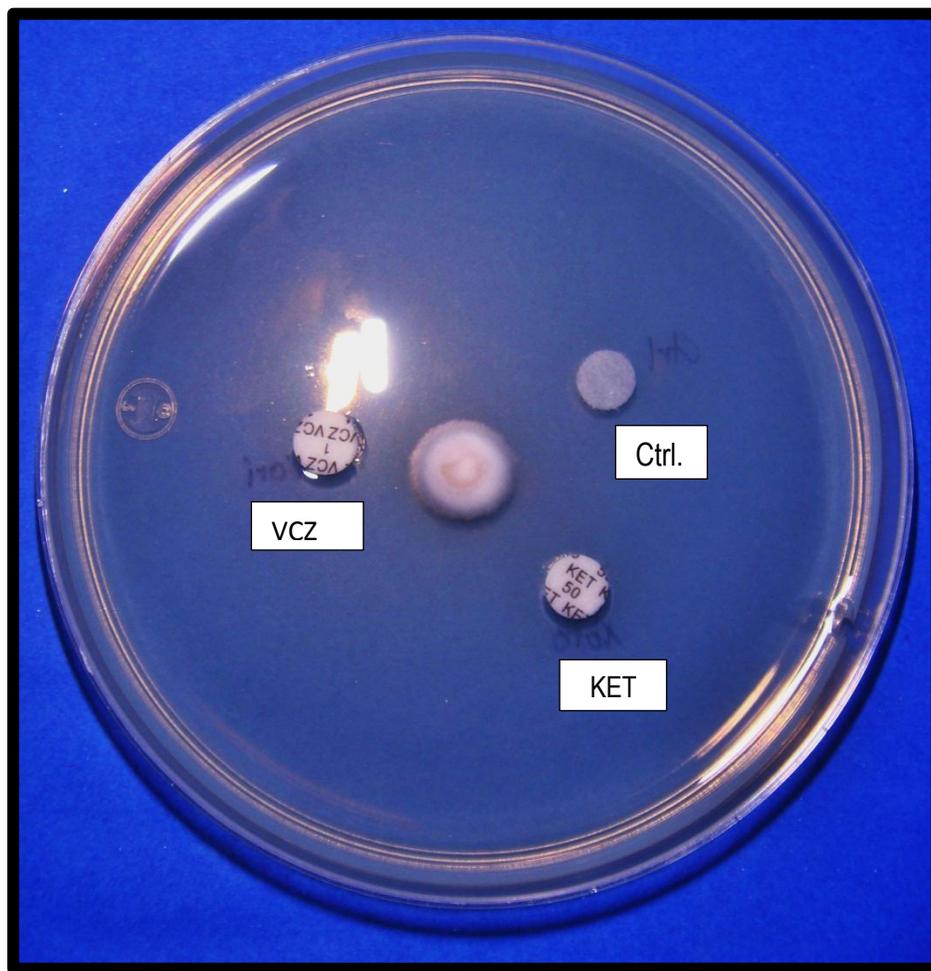
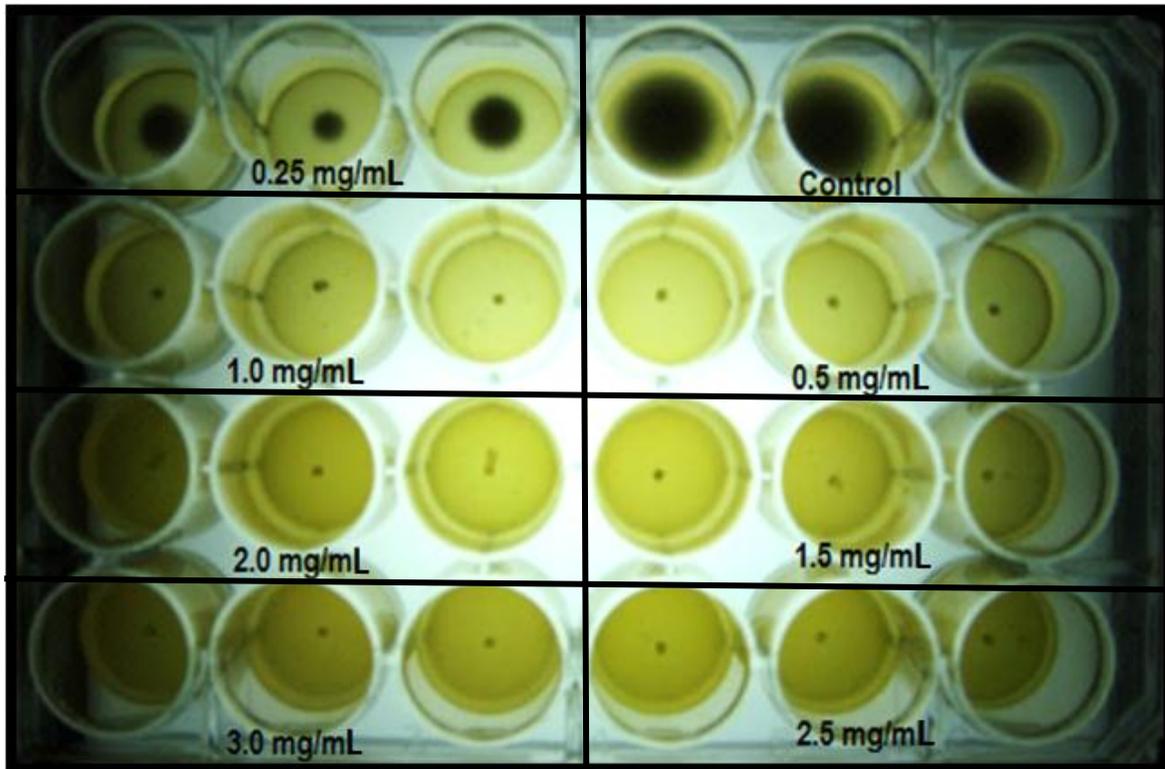


Figura 14. Sensibilidad del *Trichophyton mentagrophytes* frente a antifúngicos. (Resultados obtenidos ante los 2 diferentes antifúngicos a los que se enfrentó el hongo: Control: etanol 70%, Ketoconazol: 50  $\mu\text{g}$  y Voriconazol: 1  $\mu\text{g}$ ). (Martínez, 2013).

**Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del Extracto Etanólico de Propóleo sobre *T. mentagrophytes* por el método de Dilución en placa de 24 pozos.**

En esta prueba podemos observar, que *Trichophyton mentagrophytes* creció en los pozos controles, así como en los pozos cuya concentración corresponde a 0.25 mg/mL de EEP (Ver Figura 15). Sin embargo, a partir de la concentración de 0.5 mg/mL en adelante, no se presentó desarrollo colonial, por lo que se considera que la Concentración Mínima Inhibitoria para *T. mentagrophytes* es de 0.5 mg/mL de Extracto Etanólico de Propóleo.

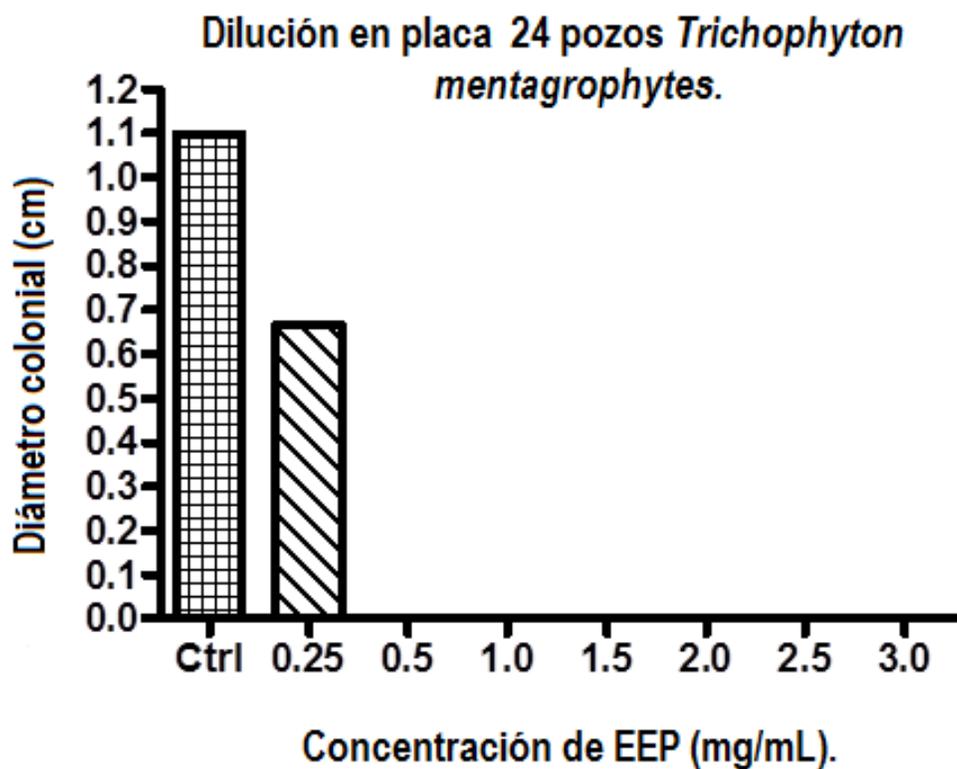


**Figura 15. Determinación CMI para *T. mentagrophytes*. (Resultados obtenidos para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria para *T. mentagrophytes*, determinando que esta corresponde a la concentración de 0.5 mg/mL en la cual se presentó una inhibición total del microorganismo). (Martínez, 2013).**

Tabla No. 6. Determinación de Concentración Mínima Inhibitoria de EEP de FESC sobre el crecimiento de *Trichophyton mentagrophytes* en Placa de 24 pozos.

Concentración (mg/mL)	Resultados (cm)			Promedio
3.0	-----	-----	-----	-----
2.5	-----	-----	-----	-----
2.0	-----	-----	-----	-----
1.5	-----	-----	-----	-----
1.0	-----	-----	-----	-----
0.5	-----	-----	-----	-----
0.25	0.8	0.4*	0.8	0.8
Control	1.1	1.0	1.2	1.1

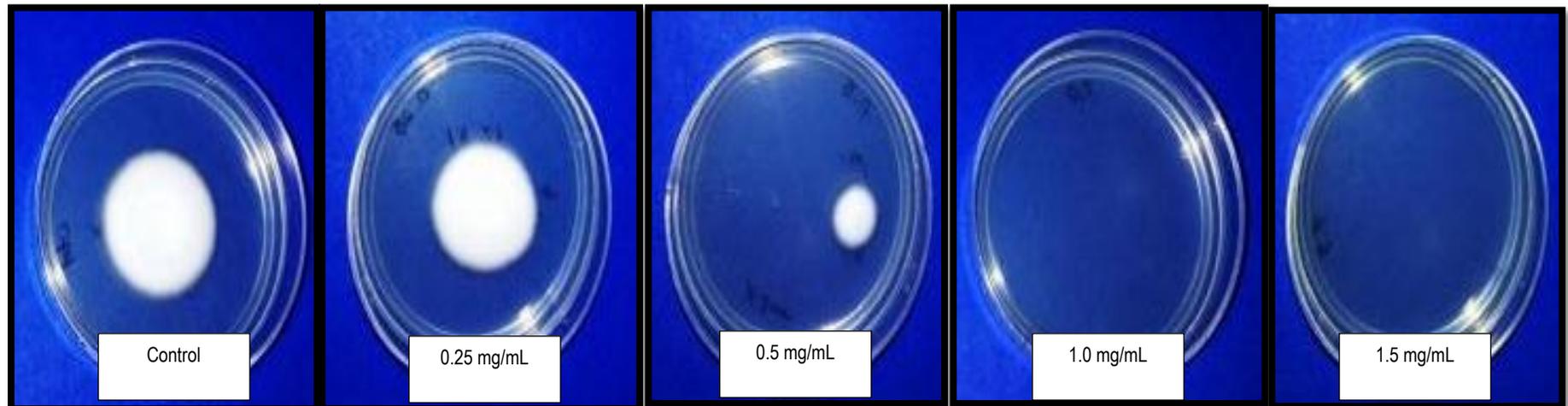
\*Dato descartado.



Gráfica 1. Dilución en placa para la determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria para *T. mentagrophytes*. (En ella se puede demostrar estadísticamente el desarrollo colonial tanto en el Control como en la concentración de 0.25 mg/mL).

### Determinación Concentración Fungicida Mínima.

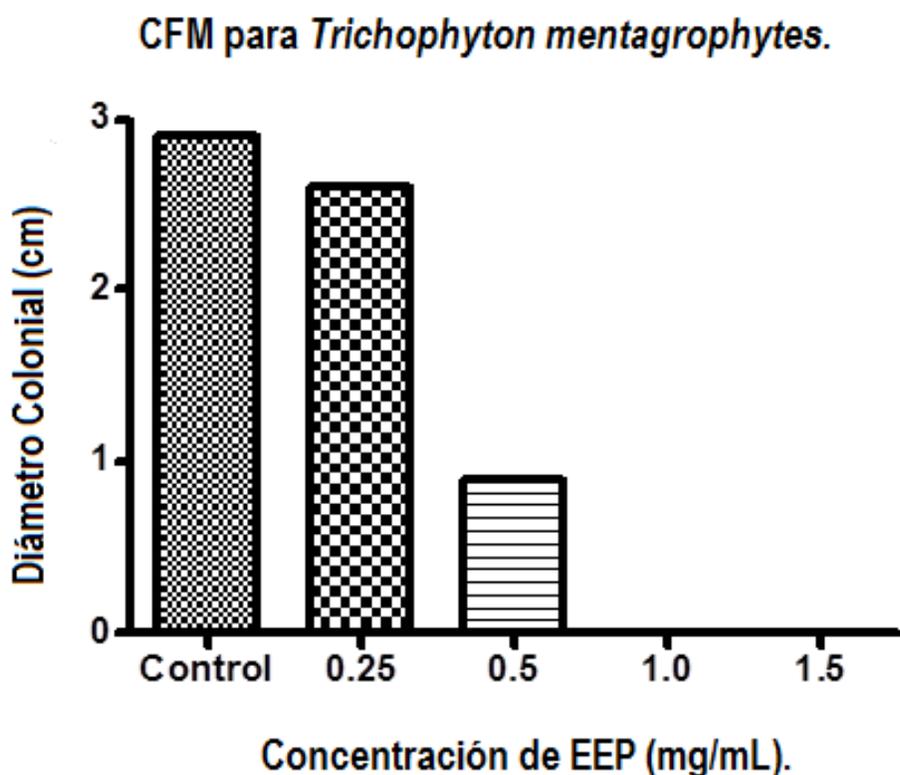
Para esta prueba se examinaron cuatro concentraciones de EEP: 0.25, 0.5, 1.0 y 1.5 mg/mL, además de una muestra control; transcurridas las 24 horas de contacto con el EEP se colocaron 10  $\mu$ L al centro de placas Petri chicas con agar SDA. Después de incubar las placas durante 7 días, se pudo observar que a partir de la concentración 1.0 mg/mL de EEP no hubo desarrollo colonial del hongo, por lo que se consideró esta concentración como la concentración fungicida mínima. Se puede ver en la Figura 16 que a las concentraciones de 0.25 y 0.5 mg/mL, el diámetro de las colonias se vio reducido en comparación con el control, siendo más representativa la reducción en la segunda concentración en comparación con la primera.



**Figura 16. Determinación de la concentración Fungicida Mínima para *T. mentagrophytes*. (En las imágenes podemos observar que a partir de la concentración 1.0 mg/mL no se presenta desarrollo colonial; además de que se observó la reducción del diámetro colonial para las concentraciones de 0.25 y 0.5 mg/mL). (Martínez, 2013).**

Tabla No. 7. Determinación de Concentración Fungicida Inhibitoria del extracto etanólico de propóleo de la FESC sobre *T. mentagrophytes*.

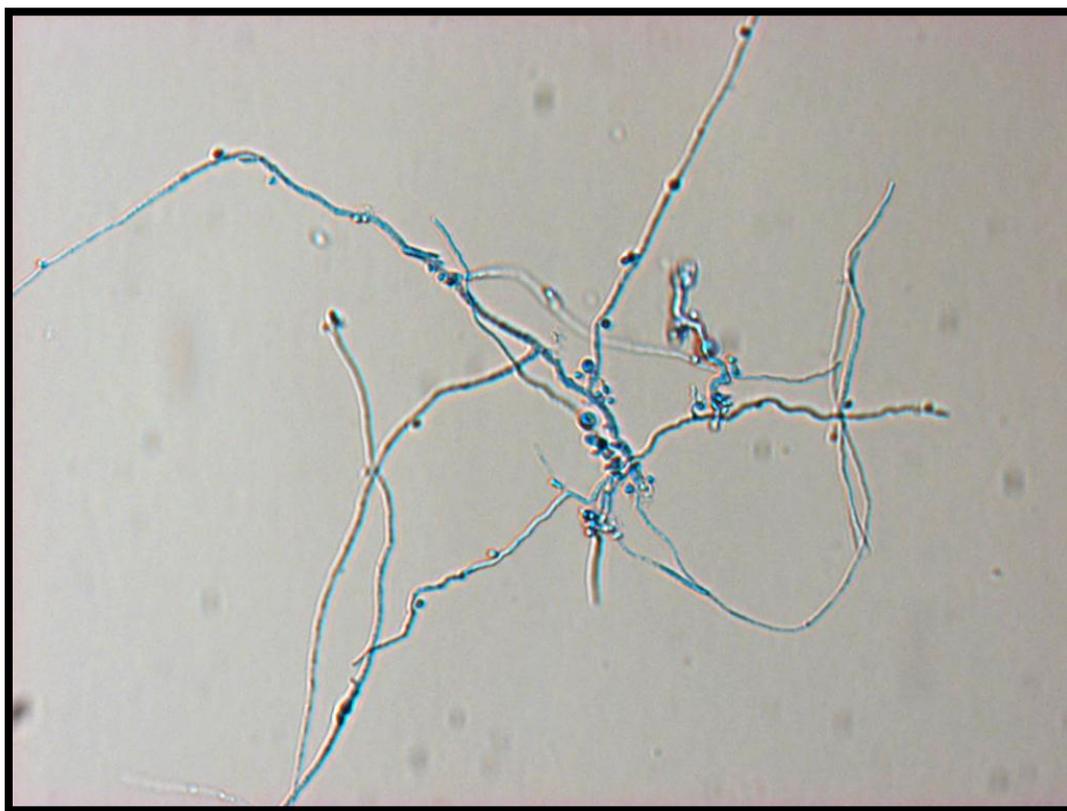
Concentración (mg/mL)	Diámetro Colonial (cm)
Control	2.9
0.25	2.6
0.50	0.9
1.0	-----
1.5	-----



Grafica 2. Concentración Fungicida Mínima para *Trichophyton mentagrophytes*. (En la gráfica podemos observar como a partir de la concentración de 1.0 mg/mL en adelante, no se presentó desarrollo colonial, por lo que se considera que la concentración de 1.0 mg/mL presenta una actividad fungicida ante *Trichophyton mentagrophytes*).

### **Evaluación de Daño Celular.**

Para la evaluación del daño celular efectuado por el extracto etanólico de propóleo sobre *Trichophyton mentagrophytes* se consideraron las siguientes concentraciones: 0.25, 0.5, 1.0 y 1.5 mg/mL, además del control. Se puso en contacto con el hongo cada una de las respectivas concentraciones, por un periodo de 24 horas; una vez transcurrido ese tiempo se observaron al microscopio las estructuras celulares y se prosiguió a realizar el análisis de imagen.



**Figura 17. Estructuras celulares de *T.mentagrophytes* muestra control, tinción azul de algodón 40x. (Se apreciar algunas hifas, microconidios y clamidosporas, nótese que las estructuras se encuentran perfectamente teñidas en su material intracelular).**

**(Martínez, 2013).**



Figura 18. Daño efectuado sobre hifa de *T. mentagrophytes* , a una concentración de 0.25 mg/mL de EEP vista en 40x. (En ella podemos observar el vaciamiento del material intracelular de la hifa puesto que solo se tiñen algunas partes de la misma vista a 40x).  
(Martínez, 2013).

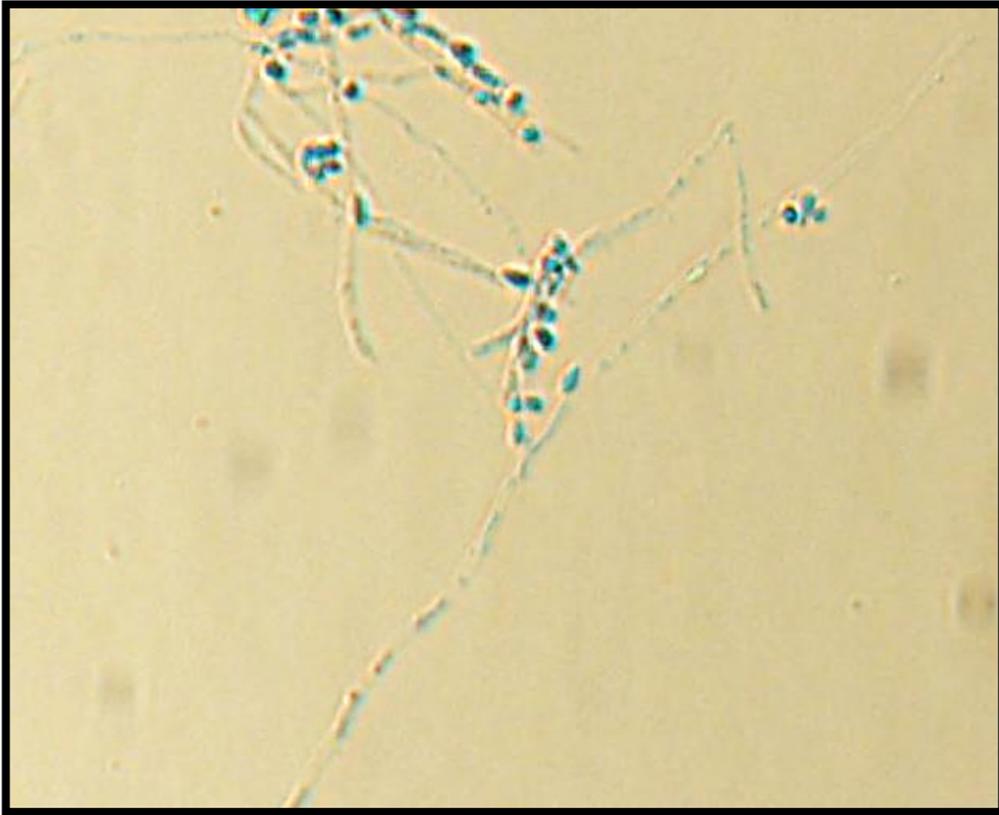


Figura 19. Daño efectuado sobre *Trichophyton mentagrophytes* a una concentración de 0.5 mg/mL de EEP vista en 40x. (Se logra apreciar el vaciamiento del material intracelular de la hifa; dando la impresión de su fraccionamiento, al solo teñirse algunas áreas).  
(Martínez, 2013).

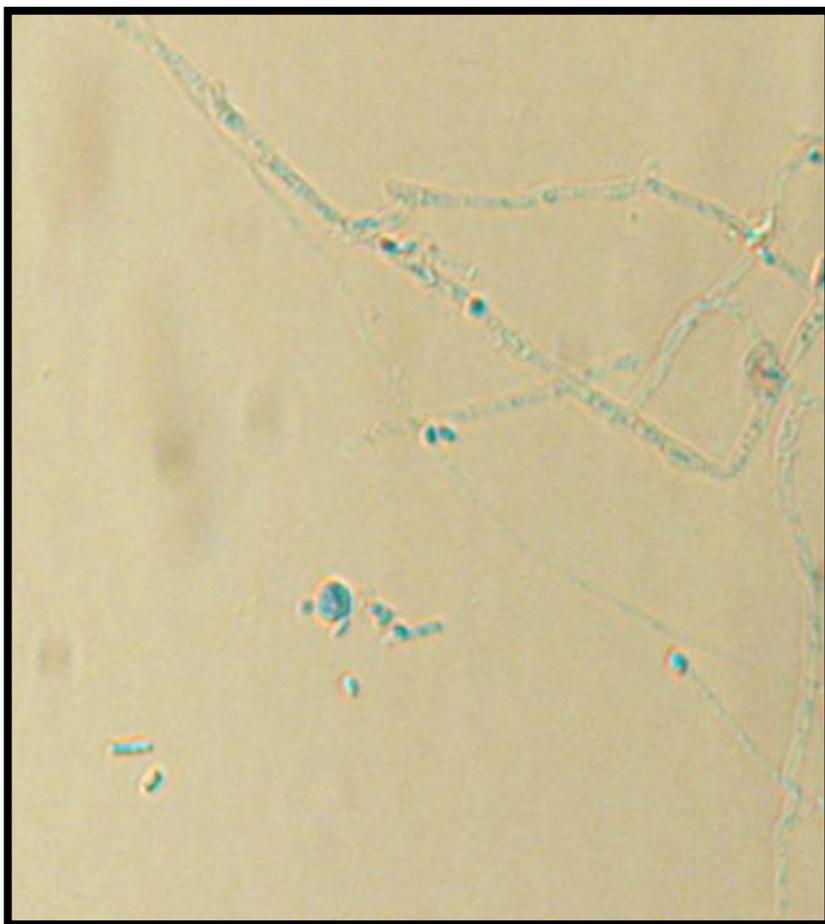
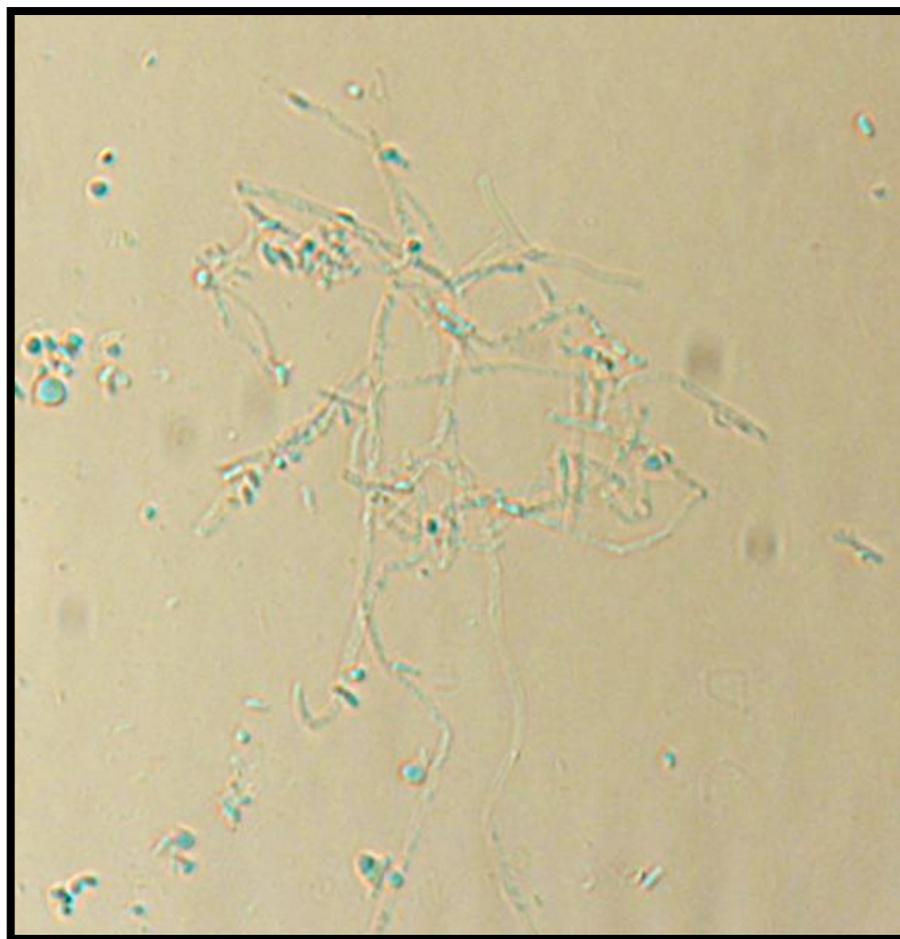
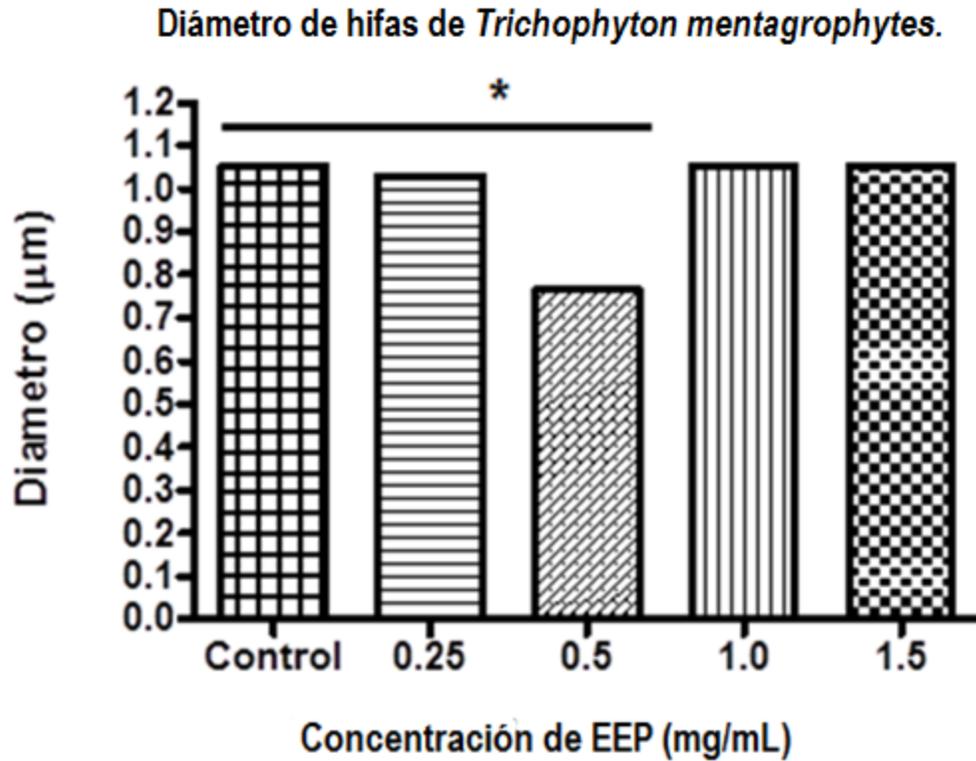


Figura 20. Daño efectuado sobre *Trichophyton mentagrophytes* a una concentración de 1.0 mg/mL de EEP vista a 40x. (Presentó vaciamiento del material citoplasmático de las hifas, además de la disminución del número de conidios en comparación con la imagen de la muestra control). (Martínez, 2013).



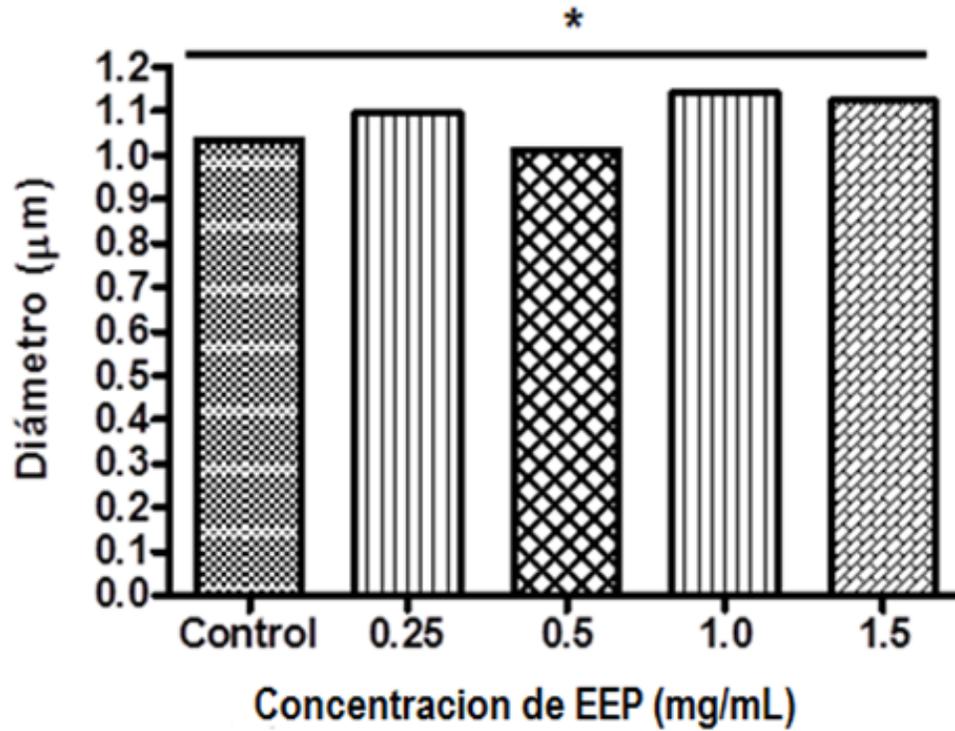
**Figura 21. Daño efectuado sobre *Trichophyton mentagrophytes* a una concentración de 1.5 mg/mL de EEP vista a 40x. (Resalta nuevamente el vaciamiento del material citoplasmático presente en las hifas, en comparación con la muestra control).  
(Martínez, 2013).**

Una vez obtenidas las imágenes se prosiguió a realizar el análisis de las mismas, en el cual se consideró: diámetro de hifas, conidios, así como el número de conidios por campo; considerando 10 campos, al igual que 10 estructuras tanto para hifas y conidios.



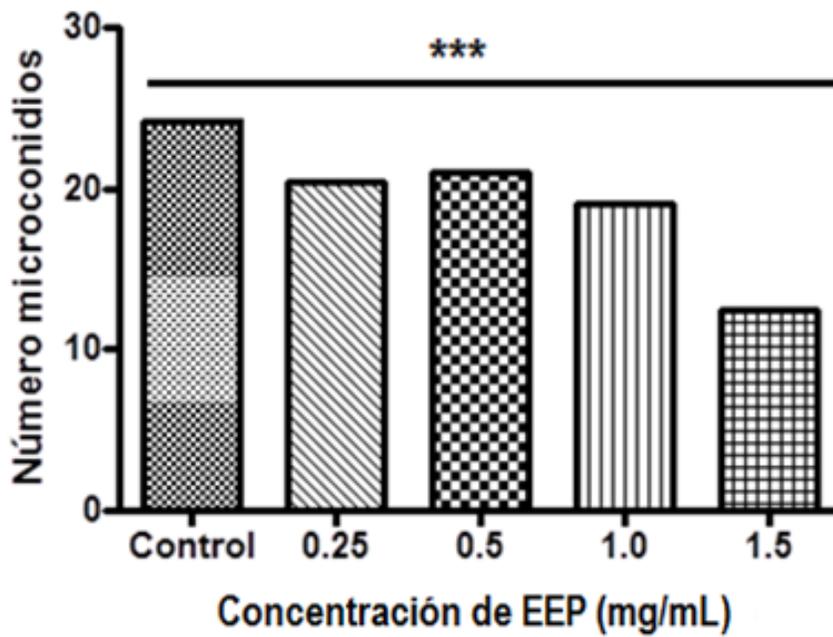
Grafica 3. Daño Celular del EEP sobre el diámetro de las hifas de *T. mentagrophytes*. (Se muestran alteraciones en cuanto a su diámetro a una concentración de 0.5 mg/mL, como se puede observar existe una disminución del diámetro en comparación con el control, aunque representa una diferencia estadísticamente poco significativa (\*=  $p < 0.05$ )).

Diámetro de microconidios *Trichophyton mentagrophytes*.



Grafica 4. Evaluación del diámetro de microconidios, después del tratamiento con diferentes concentraciones de EEP. (No se mostraron diferencias significativas se puede observar un ligero aumento en el diámetro con respecto al control en comparación a las concentraciones 1.0 y 1.5 mg/mL respectivamente; aunado a ello, el análisis estadístico no muestra una diferencia significativa relevante (\*= $p < 0.05$ )).

Número microconidios por campo *Trichophyton mentagrophytes*.



Grafica 5. Evaluación del número de microconidios por campo después del tratamiento con diferentes concentraciones de EEP. (Se observa una disminución significativa en comparación a la muestra control, la concentración 1.5 mg/mL presenta una depreciación más notable, mostrando una referencia estadísticamente significativa de  $p < 0.001$  (\*\*\*)).

## Discusión

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del EEP sobre *T. mentagrophytes*. En primera instancia se dispuso realizar la identificación de la cepa proveniente de una muestra clínica, para ello se realizó un subcultivo del primo aislamiento en agar Borelli obteniendo una colonia algodonosa, aterciopelada y color blanco, algunos autores describen esta variedad como color crema o amarillo (Forbes. *et. al.* 2009); la pigmentación amarilla que se aprecia al reverso de la caja se debe a que se trata de un cultivo joven como se aprecia en la Figura 7.

Asimismo, se realizaron otras pruebas de identificación como: microcultivo para la observación microscópica y la prueba de urea. En la primera, se pudo apreciar la presencia de hifas en espiral características de esta especie como se muestra en la Figura No. 8., cabe resaltar que esta característica solo se logra apreciar en el 30% de los aislamientos (Bayley, 2004), la cual, se va perdiendo conforme se van realizando subcultivos de la cepa. Por otra parte, la prueba de urea de Rustigian y Stuart se realizó para asegurar la identidad de la cepa al diferenciarla de *T. rubrum*, debido a que *T. mentagrophytes* produce urea positiva contrario a *T. rubrum*; ya que posee la capacidad de producir una enzima llamada ureasa, capaz de metabolizar la urea presente en el medio (Urea de Rustigian y Stuart) y producir metabolitos alcalinos que viran el medio de rosa a rojo (Ver Figura No. 10), o bien como describen algunos autores color rosado rojo (MacFading, 2003).

Una vez identificada la cepa, se prosiguió a realizar las pruebas de sensibilidad ante el Extracto Etanólico de Propóleo (EEP) de la FES Cuautitlán, observando una particular susceptibilidad de este microorganismo como se describirá a continuación.

Los resultados muestran en las Figuras 11 y 12, la Prueba de Inhibición de Crecimiento radial en Agar Dextrosa Saboraud, en ellas se puede observar la inhibición parcial de *Trichophyton mentagrophytes*, al estar en contacto con discos sensibilizados con el extracto etanólico de propóleo de la FESC a diferentes concentraciones: control (Etanol 70%), 2 mg, 4 mg y 8 mg, por la formación de medias lunas o depresiones. En ellas podemos observar una inhibición en el crecimiento a partir de los 2 mg en comparación con el control, en el que incluso el hongo creció por encima del disco; para las concentraciones de 4 y 8 mg no hubo diferencia significativa entre estas, puesto a que los halos de inhibición se encuentran muy parecidos, esto puede deberse a (Santos, 2010) que las técnicas de difusión en agar con disco tienden a mostrar resultados variables debido a factores como la temperatura y el tiempo de incubación; además a temperaturas bajas, las sustancias difunden más lentamente en el agar (Trejos, 2009). Prats 2005, hace mención a técnicas consideradas de referencia por el NCCLS (CLSI) para el estudio de la sensibilidad de hongos pero en medio líquido, en las que se encuentran estandarizadas en cuanto al medio de cultivo, tampón, pH, inóculo, tiempo y temperatura de incubación; permitiendo cuantificar la inhibición del crecimiento que produce el antifúngico; sin embargo la mayoría de estas técnicas están enfocadas para hongos levaduriformes lo cual descarta su aplicación para ser empleadas en hongos filamentosos, además de su difícil manejo y control de su crecimiento debido a la esporulación.

A pesar de no ser una prueba cuantitativa los resultados obtenidos para en ella, nos proporcionan un parámetro cualitativo para conocer que el Extracto Etanólico de propóleo de la FESC si muestra una inhibición parcial sobre el crecimiento de este dermatofito proporcionándonos un parámetro de referencia para las siguientes pruebas. De forma paralela, se evaluó la sensibilidad de *T.mentagrophytes* frente a 4 antifúngicos presentes en el mercado: Clotrimazol (0.05 mg), Voriconazol (0.001 mg), Ketoconazol (0.05 mg) y Miconazol

(0.05 mg); encontrando que el microorganismo muestra sensibilidad a los 4 antifúngicos (Ver figuras 13 y 14) siendo más efectivos clotrimazol y voriconazol, en comparación con los otros 2. Aunque las concentraciones de los antifúngicos son mucho menores en comparación con las empleadas de EEP no es menos relevante la evidencia de que el EEP presentó actividad sobre el hongo, además de que en lo que respecta a toxicidad en comparación con los derivados azólicos, este les lleva ventaja. Cabe resaltar que en las Figuras 13 y 14 se empleó un control con Etanol al 70% y en ellas se puede apreciar como si este presentase un efecto inhibitorio sobre *Trichophyton mentagrophytes*; sin embargo, el efecto se debió muy probablemente a la difusión de los antifúngicos en el medio y no propiamente del control, puesto que con anterioridad se había evaluado el control con Etanol en la prueba de Difusión radial y no se observó inhibición, incluso el hongo creció por encima del disco (Figura 11).

Lo referente a la prueba para la determinación de la concentración mínima inhibitoria del EEP sobre *T. mentagrophytes*, por el método de dilución en placa de 24 pozos, se encontró que a partir de la concentración de 0.5 mg en adelante no se observó desarrollo colonial como se puede corroborar en la Figura No.15. considerando una CMI de 0.5 mg/mL. Es importante aclarar, que el dato marcado con un asterisco en la Tabla No. 6., no se descartó discriminadamente, para ello se realizó un análisis estadístico (Graph Pad Prism Versión 6) de los datos obtenidos, en dicho análisis se descartó el valor de 0.4 mm al encontrarse fuera de linealidad, por lo que es importante aclarar que no se eliminó deliberadamente. Así mismo, es importante mencionar que debido a que no se encontró actividad del etanol sobre *T. mentagrophytes* en las técnicas de difusión radial y sensibilidad a antifúngicos, se decidió emplear únicamente agar como control en las pruebas para la determinación de la CMI, CFM y daño celular; sin embargo es importante considerar su empleo para tener un comparativo bajo las mismas condiciones tal y como se realizó en las primeras dos técnicas.

Para la determinación de la CFM posterior a las 24 horas de incubación en placa, encontramos que a una concentración de 1.0 mg/mL, el EEP tiene acción fungicida en comparación con la CMI de 0.5 mg/mL obtenida, por lo tanto se considera que a 0.5 mg/mL el EEP presenta una acción fungistática sobre *T. mentagrophytes*.

Con base en los resultados previamente obtenidos para CFM, así como a lo referido en Londoño 2010, en donde señala que para la evaluación de daño celular se debe emplear el doble de la Concentración Mínima Inhibitoria; para este caso el doble de 0.5 mg/mL, lo cual coincide con los resultados obtenidos en la Concentración Fungicida Mínima de 1.0 mg/mL de EEP. Como se describe en la metodología, para la evaluación del daño celular se emplearon las siguientes concentraciones: Control, 0.25, 0.5, 1.0 y 1.5 mg/mL de EEP, las cuales se llevaron a incubación durante 24 horas en contacto con el hongo, previamente estandarizado por turbidimetría con el tubo 0.5 del Nefelómetro de McFarland como lo indica la técnica.

Posteriormente, se llevó a cabo el análisis de imagen empleando la tinción de azul de algodón y el programa Q. Capture Pro. 6.0. para realizar la medición de las estructuras. En la Figura 17 resalta la completa tinción del contenido citoplasmático tanto en hifas como en los microconidios, en comparación con la Figura 18, propio de la concentración 0.25 mg de EEP, en la imagen se puede apreciar el vaciamiento del material intracelular en la hifa, donde al tñirla solo se colorearon ciertas partes como si se hubiese fragmentado o incluso como si solo una pequeña parte del material intracelular se mantuviese. Lo mismo sucede en las concentraciones posteriores (0.5, 1.0 y 1.5 mg), como se aprecia en las Figuras 19, 20 y 21, resaltando la última concentración en la que incluso se puede observar hifas completamente vacías (Figura 21). En lo que respecta a los microconidios, no se lograron apreciar transformaciones celulares relevantes a simple vista en

el análisis de imagen realizado, así también como al diámetro de los mismos; como se observa en la Grafica 4. Y con base en el análisis estadístico realizado no mostró diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) comparado con el control, lo cual indica que no existe relevancia significativa que nos permita decir que el EEP modificó la estructura celular de los microconidios como ocurrió con las hifas; sin embargo a pesar de no verse alteraciones celulares a simple vista en el análisis de imagen, así como algún cambio significativo en cuanto a diámetro de los mismos, se puede hablar de una inhibición en su actividad al no presentarse desarrollo colonial (Figura 16); siendo desconocido el mecanismo por el cual se ve detenida su actividad. Del mismo modo, al realizar el conteo de microconidios por campo, los resultados se muestran muy diferentes; en la Grafica 5, se muestran en número de microconidios obtenidos por campo, en donde el comportamiento tiende por el decrecimiento de la gráfica, por lo que se puede afirmar que el EEP no produjo alteraciones celulares visibles, pero si logro disminuir en cuanto a número la presencia de microconidios a simple vista; para lograr una mayor precisión en cuanto a esta afirmación se sugiere realizar una estandarización del inóculo mediante el empleo de una Cámara de Neubauer como lo menciona Santos (2010), con la finalidad de determinar de manera más exacta, el efecto del EEP sobre la reproducción de hongo de manera cuantitativa.

En lo que respecta al análisis de imagen de las hifas, los resultados obtenidos nos permitieron apreciar cambios significativos a nivel estructural, a simple vista nos permite afirmar que se produjo un vaciamiento del material intracelular de estas estructuras, sin dejar claro el mecanismo de acción. Se llevó a cabo la medición del diámetro de las hifas para cada concentración, los resultados obtenidos se plasman en la Grafica 3, en ella se observa que a partir de la concentración de 0.25 hasta 0.5 mg/mL ocurre un declive en cuanto al diámetro de las hifas, pero a partir de la concentración de 1.0 mg aumenta de nuevo, esto se puede justificar de la siguiente manera: de manera tentativa se cree que se vacía el contenido intracelular de las hifas, posteriormente al presentarse huecos en la hifa y al encontrarse en un medio acuoso pudiese darse en fenómeno de hinchamiento estructural, lo que explicaría el aumento del diámetro, este fenómeno es más notorio a partir de la concentración de 0.5 mg de EEP en adelante. Se plantea la posibilidad que a partir de la concentración de 1.0 mg la hifa se vuelve disfuncional, la Figura 16 nos permite corroborar esta idea puesto que a esa concentración no se presenta un desarrollo colonial, siendo esta la concentración que presenta actividad fungicida y por tanto nos permite afirmar que la concentración de 0.5 mg de EEP actúa como fungistática.

En cuanto a la capacidad patogénica de *Trichophyton*, diversos autores reportan que el género es uno de los principales causantes de infecciones de los pies y uñas, además de ser los causantes de la tiña del cuerpo, cuero cabelludo y barba (Bailey, 2004). Sánchez 2009 clasifica a *Trichophyton mentagrophytes* como una especie de carácter zoofílico ya que generalmente afecta a animales, pero su capacidad de producir enfermedad en humanos es lo que le confiere el título de especie zoonótica, siendo la principal causa de transmisión por contacto directo con el animal infectado o indirectamente con material contaminado.

Actualmente la terapia empleada para el tratamiento de las dermatofitosis sugiere el uso de una terapia combinada: tópica y sistémica, Romero, (2007) reporta para la terapia tópica se empleen agentes queratolíticos o fungicidas y ante el fracaso de la terapia tópica emplearse la terapia sistémica; aunque ello también dependerá de la localización y extensión de las lesiones, así como características del paciente como estado inmunológico, hipersensibilidad a alguno de los componentes, tal es el caso de los pacientes con lupus eritematoso sistémico en los que la griseofulvina y el ketoconazol están contraindicados por su patología ante esta afección del paciente, reporta la Sociedad Venezolana de Dermatología<sup>38</sup>. Por su parte, Vilata (2006) menciona que los derivados imidazólicos (miconazol, econazol, clotrimazol, ketoconazol,

bifonazol) son activos por vía tópica frente a dermatofitos y de todos los componentes que pertenecen a este grupo solo el ketoconazol es efectivo por vía oral, sin embargo por terapias prolongadas puede provocar hepatitis tóxica, entre otras afecciones. Anteriormente al igual que el ketoconazol la griseofulvina era de los principales tratamientos ante estas afecciones, pero con la introducción de los triazoles (fluconazol, itraconazol) y la terbinafina, ambos quedaron en desuso. En el presente trabajo, se evaluaron 4 diferentes derivados imidazólicos como ya se mencionó, observando que la cepa de *T. mentagrophytes* presentó sensibilidad ante estos compuestos, sin embargo es importante resaltar que estos componentes presentan importantes interacciones, aunado a su resaltada toxicidad. Por su parte el propóleo, a pesar de que en la CMI y CFM las concentraciones de EEP empleadas fueron mayores en comparación con las de los componentes imidazólicos, el EEP presenta diversas ventajas sobre ellos; resaltando en primera instancia su actividad hepatoprotectora, González *et. al.* (1994) reporta la evaluación del efecto hepatoprotector del propóleo cubano sobre una hepatotoxicidad aguda inducida por altas dosis de paracetamol en modelo de ratones, así también frente a hepatopatías inducidas por acetaminofén (Ramírez *et. al.* 1994) y CCl<sub>4</sub> (González *et al.* 1995).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo son alentadores en cuanto la actividad fungicida y fungistática del EEP evaluado frente a *T. mentagrophytes*, además en comparación con algunos antifúngicos no presenta reportes de toxicidad relevantes, Burdock (1997) reporta un orden de toxicidad oral aguda bajo para el propóleo con una DL50 que va de 2000 hasta 7300 mg/kg en ratones. Reportando además una dosis segura para seres humanos de 1.4 mg/kg peso corporal al día, o aproximadamente 70 mg/día; lo cual refleja una buena seguridad para el empleo del propóleo.

Dicho lo anterior, resulta interesante lo reportado por Marccuci (1995) en donde menciona que la combinación de algunos antimicóticos con propóleo (10%) amentaron su actividad sobre *C. albicans*, teniendo el mayor efecto sinérgico cuando el propóleo fue añadido a los antifúngicos. Recientemente en el 2005, Fernández y col. describieron el sinergismo *in vitro* entre el propóleo peruano y antimicrobianos frente a *S. aureus*, encontrando que 5 de los 13 antimicrobianos empleados presentaron este fenómeno de sinergismo, las cuales fueron: cloranfenicol, gentamicina, metilmicina, tetraciclina y vancomicina. Lo anterior, abre la puerta a un campo muy virtuoso, por todas las propiedades que se mencionaron del propóleo; con respecto al trabajo desarrollado, presenta un gran campo de investigación que puede dar muchos frutos, planteando la posibilidad de presentar un sinergismo con algunos antifúngicos, pudiese aplicarse como una terapia combinada reflejándose en la disminución de los tiempos de tratamiento, con mejores resultados, además de tener propiedades: hepatoprotectoras y antiinflamatorias (en casos grades de dermatofitosis cutáneas) cumpliría una triple función: antifúngica, antiinflamatoria y hepatoprotectora, ya que como se mencionó con anterioridad algunos compuestos antifúngicos pueden desarrollar hepatopatías por toxicidad.

## Conclusiones

Con base en los resultados obtenidos podemos concluir:

El Extracto Etanólico de Propóleo (EEP) proveniente del Apiario de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM; presentó una actividad antimicótica *in vitro* frente a *Trichophyton mentagrophytes*, demostrando su sensibilidad mediante las diferentes pruebas realizadas.

Mediante la prueba de difusión radial pudimos determinar que el EEP presentó una inhibición parcial del crecimiento radial de *T. mentagrophytes*.

Se logró determinar la Concentración Mínima Inhibitoria del EEP frente a *Trichophyton mentagrophytes*, con un valor de 0.5 mg/mL posterior a los 7 días de incubación.

Del mismo modo, se determinó la Concentración Mínima Fungicida del EEP proveniente de la FES-Cuautitlán sobre este dermatofito, siendo esta la de 1.0 mg/mL, posterior a las 24 horas de contacto con el extracto.

En cuanto a la evaluación del daño celular causado por el EEP sobre *T. mentagrophytes*, se observó que el extracto generó cambios en las hifas al producir un vaciamiento del contenido citoplasmático, haciendo disfuncional la estructura. En lo que respecta a los microconidios se produjo una disminución en número, sin presentarse alteraciones sobresalientes en su estructura.

Por búsqueda bibliográfica existe poca información disponible que reporte el daño causado por extractos de propóleo sobre *Trichophyton mentagrophytes*; por ello se considera este trabajo como una aportación innovadora para este campo de investigación.

## Perspectivas

En primera instancia basta destacar la importancia del uso de una cepa de referencia, para enfrentarla con la muestra clínica empleada en el presente trabajo; lo cual nos proporcionaría datos muy interesantes en cuanto a si existe variabilidad de resultados al ponerse en contacto con las diferentes concentraciones de EEP evaluadas empleando como control la cepa de referencia.

Otra propuesta que surge es la de ampliar el rango de las concentraciones en la prueba de determinación de la concentración fungicida mínima, de 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 y 1.0 para analizar si la CFM se encuentra dentro de este rango, proporcionándonos un resultado mas exacto.

En lo que respecta a la prueba de daño celular se recomienda realizar el conteo de número de microconidios mediante el empleo de una cámara de Neubauer, posterior a su ajuste por turbidimetría con el tubo 0.5 del Nefelómetro de Mc Farland estandarizando así el inóculo; lo cual nos permitiría saber de manera cuantitativa la disminución de microconidios por campo, a las diferentes concentraciones de EEP a las que se enfrentó el hongo.

Se sugiere continuar con esta línea de investigación de tal manera que nos permita conocer el mecanismo de acción específico del EEP a nivel celular sobre *Trichophyton mentagrophytes*, para lo cual proponemos emplear la técnica de microscopia electrónica, con ella podríamos obtener datos más exactos en cuanto al mecanismo de acción del propóleo sobre las estructuras celulares de *T. mentagrophytes* y a qué nivel actúa. Así mismo, resultaría interesante plantear la posibilidad de realizar una cinética de crecimiento monitoreando cada hora su comportamiento tanto en placa como a nivel microscópico y así obtener datos más precisos del efecto del EEP frente a *Trichophyton mentagrophytes*, tomando en cuenta los puntos anteriores para su realización.

Por último, resultaría interesante enfrentar el EEP junto con diversos antifúngicos como: imidazoles, triazoles, terbinafina o griseofulvina, con la finalidad de evaluar de manera *in vivo* si esté presenta un efecto sinérgico tal y como algunos autores lo han reportado, empleando al cuyo como modelo animal. Lo mencionado anteriormente, en caso de presentar resultados positivos, abriría una puerta enfocada al mejoramiento de las terapias antifúngicas; disminuyendo su toxicidad, tiempo de tratamiento y resultados más favorables.

## Bibliografía.

1. Uribarren Berrueta Teresa (2011). *Recursos en Micología. Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Medicina. UNAM.* Recuperado de:  
<http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/micologia/generalidades.html>.
2. Tortora, Gerard J. (2007). *Introducción a la Microbiología.* (9ª ed). Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. Pág. 353.
3. Murray, Patrick R. (et.al.). (2009). *Microbiología Médica.* (6ª Ed.). Barcelona, España: Elsevier.. Pág. 715, 725, 735, 751.
4. Prats, Guillem. (2008). *Microbiología Clínica.* Madrid, España: Ed. Médica Panamericana. Pág. 85-89.
5. Vilata, Juan José C. (2006). *Micosis Cutáneas.* Madrid, España: Ed. Médica Panamericana. Pág. 49-50.
6. Palostang A. N. & Field, D. & Soames, R. (2000). *Anatomía y Movimiento Humano: estructura y funcionamiento.* Barcelona, España: Editorial Paidotribo. Pág. 36-38.
7. Fuller, J.K. & Mosso, N. S. (2008). *Instrumentación Quirúrgica: Teoría, técnicas y procedimientos.* México, D.F.: Editorial Médica Panamericana. Pág. 752-753.
8. González, G.A. & Bernal M.R. (2002). *Propóleos: un camino hacia la salud.* Jalisco, México: Ediciones cuarto día. Pág. 7-40.
9. Quintero M, Londoño A, Soto C, García C, Carrillo L, Penieres J, Cruz T. Structural and genetic alterations of fungal cells caused by mexican propolis. Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. A. Méndez-Vilas (Ed.). 2011; (3) 1068 - 1073.
10. Burdock G.A. y col. Review of the Biological Properties and Toxicity of bee Propolis( Propolis). USA. *Rev Food and Chemical Toxicology*, 1997 (36) 347-363.
11. Estrada, Alejandra (2012). *Evaluación in vitro del Efecto del Propóleo sobre Microsporim canis.* (Tesis de Licenciatura). Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.
12. Banskota A, Tezuka Y, Kadota S. Recent Progress in Pharmacological Research of Propolis. Japan. *Phytother Res.* 2001 (15) ,561-571.
13. Gutiérrez Elisa (2011). *Actividad antibacteriana y perfil químico de propóleos mexicanos sobre cepas de Pasteurella multocida aisladas de conejos.* (Tesis de Maestría). Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.
14. Marcucci MC. Propolis: chemical composition, biological, properties and therapeutic activity. Brazil. *Rev Apidología Elsevier* 1995 (26), 83-99.

15. Tortora, J. G. & Reynolds G. S. (2004). *Principios de Anatomía y Fisiología*. (9° Ed.) México: OXFORD, University Press. Pág.143-153.
16. Koneman, W. Elemer (et.al.). (1999). *Diagnóstico Microbiológico: texto y atlas*. (5ta. Ed.) Buenos Aires, Argentina: Ed. Médica Panamericana. Pág. 964,992-996.
17. Forbes, Betty (et.al.).(2009). *Bailey & Scott: Diagnóstico Microbiológico*. (12°Ed.) Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana. Pág. 662-665.
18. Martínez Galán Paúl (2009). *Caracterización Físicoquímica y evaluación de la actividad antifúngica de propóleos recolectados en el suroeste antioqueño*. (Tesis de Maestría) Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia Sede Medellín.
19. Saiz M, Lobo C, Serrano J. Conferencia: Actividad antitumoral del propóleo. *Natura medicafrax*. 2002.
20. Rubio Ma.C, Rezusta, Gil J.T, Benito R. Perspectiva micológica de los dermatofitos en el ser humano. España. *Rev Iberoam Micol* 1999 (16), 16-22.
21. Carlotti D. (1999). Tratamientos de la dermatofitosis. En: Locke P, Harvey R, Mason I. Manual de dermatología en pequeños animales. Reino Unido: Ediciones S, Colección BSAVA (British Animal Veterinary Association). 313-318.
22. Tay,Z.Jorge. (2010). *Microbiología y Parasitología Médicas*. (3ª Reimp.) México, D.F: Méndez Editores. Pág. 697-703.
23. Brooks, Geat. (et.al). (2001). *Microbiología Médica de Jawetz, Melnick y Adelberg*. (17°Ed.). D.F: El Manual Moderno. México, Pág. 665-669.
24. MacFaddin. (2003). *Pruebas Bioquímicas para la Identificación de Bacterias de Importancia Clínica*. (3ªEd.). Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana. Pág. 397-409.
25. López Zamora Christian. (2012). *Evaluación in vitro del Efecto del Propóleo sobre Mycosporium gypseum*. (Tesis de Licenciatura). Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.
26. Ptel, A. & Forsythe, P. (2010). *Dermatología de pequeños animales*. Madrid, España: Elsevier. Pág. 9 y 10.
27. Premoli G, Laguado P, Díaz N, Romero C, Villareal J, González A. Uso del propóleo en odontología. *Acta Odontológica Venezolana* 2010; 48 (2): 1 - 13.
28. Schaechter, Moselio (et.al). (2001). *Microbiología de las enfermedades infecciosas*. (2ª Ed.). Buenos Aires, Argentina: Medica Panamericana. Pág. 613-616.
29. Romero, C. Raúl. (2007). *Microbiología y Parasitología Humana*. (3a. Ed.). México, D.F: Médica Panamericana. Pág. 1123.
30. Vélez, A. H. & Rojas, M. W. Et. al. (2003). *Fundamentos de Medicina. Enfermedades Infecciosas*. (6ª Ed.). Bogotá, Colombia: Corporación para Investigaciones Biológicas. Pág. 364-365.

31. Vélez, A. Hernán, et. al. (2002). *Dermatología: fundamentos de medicina*. (6ª Ed.). Bogotá, Colombia: Corporación para investigaciones Biológicas. Pág. 171.
32. Klaw Wolff... [et. al. ] . (2009). *Dermatología en Medicina General*. (7ª Ed.) Buenos Aires, Argentina: Médica Panamericana. Pág. 2212-2216.
33. Ruíz, V. A. & Moreno S. G. (2005). *Tratado de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. Madrid, España: Médica Panamericana. Pág. 119-120.
34. Lambrich A, Lecha M. Tratamiento actual de las Onicomycosis: revisión del tema. Uruguay. *Rev Med Uruguay*.2003 (19), 93-106.
35. León de González M. Avances en Micosis Superficiales. Venezuela. *Rev Dermatologica Venezolana* 1990,28 (3),87-89.
36. Mayta-Tovalino F, Sacsquispe-Contreras S, Ceccarelli-Calle J, Alania-Mallqui J. Propóleo Peruano: una nueva alternativa terapéutica antimicrobiana en estomatología. Perú. *Rev Estomatol Herediana* 2012,22(1),50-58.
37. Bailey and Scott (2004). *Diagnóstico Microbiológico*. (11ª Ed.). Madrid, España: Editorial Médica Panamericana. Pág. 777-784.
38. Fernandes A, Cristina E, Cristina J, De Oliveira R, Ribeiro de Souza M, Cezar A. Propolis: anti-Staphylococcus aureus activity and synergism with antimicrobial drugs. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2005; 100(5). URL disponible en: [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0074-02762005000500018&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0074-02762005000500018&script=sci_arttext) (Fecha de acceso: 20 agosto 2008).
39. Ramírez D. Gonzáles A. Rodríguez S. et al. Hepatoprotective effect of the Cuban red Propolis on the toxicity induced in mice by the administration of acetaminophen. *Rev Cubana Farm* 1994 (28), 5-54.
40. González R. Corcho I, Ramirez D. et al. Hepatoprotective effects of propolis extract on paracetamol-induced liver damage in mice. *Phytother Res*. 1994(8), 229-232.
41. González R. Corcho I, Ramirez D. et al. Hepatoprotective effects of propolis extract on carbon tetrachloride-induced liver injury in rats. *Phytother. Res* 1995(9), 14-17.
42. Sánchez-Saldaña L, Matos-Sánchez R, Kumakawa Sena H. Infecciones micóticas superficiales. Perú. *Rev Dermatología Peruana* 2009,19 (3):226-266.
43. Trejos López Johanna (2009). *Evaluación de Parámetros para pruebas de susceptibilidad antifúngica en hongos filamentosos mediante la técnica de difusión en agar*. (Tesis de Licenciatura). Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias. Bogotá, Colombia.
44. Santos, P.E., Córdoba S. Rodero L.L., Carrillo-Muñoz A.J. (2010). *Tinea capitis*. Experiencia de 2 años en un hospital de pediatría de Buenos Aires, Argentina. *Rev. Ibe. de Micología*. 27 (2), 104-106.

45. Prats G. (2005). *Microbiología clínica*. España: Editorial Médica Panamericana. Pág. 103 - 105.
46. Daza Lesmes Javier (2007). *Evaluación clínica-funcional del movimiento humano corporal*. Bogotá, Colombia. Editorial Medica Internacional. Pág. 197.
47. Bonifaz, Alexandro. (2012). *Micología Médica Básica*. 4ª. Edición. Mc Graw Hill. China. Pág. 93-96.
48. Murray P, Rosenthal K, Pfaller. (2009). *Microbiología Médica*. 6a Edición. ELSEVIER MOSBY. Barcelona, España. Pág. 60-65.
49. Vilata, Correll J.J. (2005). *Micosis cutáneas*. Editorial Médica Panamericana. Barcelona, España. Pág. 30-33.
50. Londoño OA. Estudio comparativo de la actividad antifúngica de un extracto de propóleo mexicano y de tres plantas que *Apis mellifera* usa para su producción. (Tesis de doctorado) Cuautitlán Izcalli (Estado de México) México. Instituto tecnológico de Costa Rica 2010.