



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN

**“Evaluación de la actividad antimicótica de
propóleos mexicanos contra cepas clínicas de
Malassezia pachydermatis”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA**

P R E S E N T A:

KARLA PAZ GÓMEZ

ASESOR: M.C. Nelly Tovar Betancourt

COASESOR: Dr. Tonatiuh Alejandro Cruz Sánchez

CUAUTILÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2018



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.

Este trabajo de tesis se realizó en el Laboratorio 6 de Bioprospección Microbiológica en la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán campo 4 - UNAM, bajo responsabilidad del Dr. Tonatiuh A. Cruz Sánchez.

Trabajo realizado gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación en Innovación Tecnológica (PAPIIT) 200915.

Los resultados parciales de este trabajo se han presentado en el siguiente foro académico:

IX Congreso Nacional de Micología Médica “Dr. Amado González Mendoza y Dr. Jesús Mayorga Loera”, celebrado del 19 al 21 de octubre del 2017 en Guadalajara Jalisco, con el trabajo en modalidad cartel “Evaluación de la actividad antimicótica de propóleos mexicanos contra cepas clínicas de *Malassezia pachydermatis*”.



Agradecimientos

Mi primer agradecimiento va dirigido a mi querida Universidad Nacional Autónoma de México por haberme brindado un espacio para formarme intelectual y académicamente y por darme las herramientas necesarias para ser una profesionista digna de representar a la institución más importante de Latinoamérica.

Agradezco a mis padres por haberme guiado y por haberme acompañado en todos los momentos de mi trayecto hasta ahora, a mi padre por el gran sacrificio que día a día y con gusto realizó para darme todo lo necesario para llegar hasta donde estoy, a mi madre por su empeño y dedicación en realizar siempre lo correcto, por enseñarme el valor de las cosas y por estar siempre a mi lado. Agradezco a mis hermanos por su comprensión y compañía en todos los momentos que pudieron, así como agradezco la expectativa siempre vigente a ser su ejemplo de hermana mayor.

A mi familia en general, a mis tíos y primos, a mis abuelos, a mis amigos que también son mi familia y por supuesto a mis suegros que con su fe en mi contribuyeron a que esto fuera posible.

A mis profesores de la licenciatura en especial al Dr. Ricardo Santiago D., por ser un gran ejemplo a seguir. Agradezco a mi asesora Nelly que, a pesar de ser una gran médica, madre, y profesora me brindó parte de su tiempo y la ayuda necesaria para culminar este trabajo. Al Dr. Tonatiuh por el apoyo y tiempo brindado y por ofrecerme un espacio para trabajar y desarrollar mi trabajo de titulación.

Quiero agradecer, por último, pero no menos importante, más bien lo contrario, al gran amor de mi vida, Javier ya que, sin él, mucho de esto no sería posible, agradezco su apoyo realmente incondicional, su constante ayuda y su presencia en todo momento. Agradezco al comunicólogo que por muchas ocasiones se convirtió en bioquímico para ayudar con este gran proyecto de mi vida. Este trabajo va dedicado con mucho cariño y amor hacia él, por el tiempo también invertido para que esto fuera posible y sobre todo por ser mi gran confidente, amigo y esposo.

I. Resumen

El propóleo es una resina cerosa, de composición compleja, que las abejas elaboran y utilizan en la construcción, reparación, aislamiento y protección de la colmena. Actúa como un antiséptico para prevenir infecciones microbianas de las larvas, las reservas de miel y los panales. En cuanto a su composición ésta es susceptible a la ubicación geográfica, origen botánico, y las especies de abejas. Los flavonoides son componentes importantes del propóleo, ya que se les ha atribuido principalmente la actividad antimicótica antimicrobiana, antiviral, respuesta inmunomoduladora y antiinflamatoria.

El propóleo, actualmente ha sido utilizado como tratamiento alternativo contra infecciones micóticas en animales. *Malassezia pachydermatis* es una levadura lipofílica saprófita, que suele encontrarse en la piel sana de perros y de gatos, pero en casos donde el sistema inmune del paciente está involucrado en alguna otra patología, la levadura se multiplica causando afectaciones en la zona donde se encuentra. Esta levadura es la causa principal de la otitis canina externa, padecimiento que se caracteriza por una inflamación en el conducto auditivo externo del perro, y que presenta eritema, aumento de la descarga o descamación del epitelio acompañada de dolor y/o irritación. La otitis canina externa es una patología común en perros, que es tratada actualmente con agentes imidazólicos, o en casos resistentes se utiliza itraconazol o ketoconazol a diferentes concentraciones. Debido a la problemática que se presenta con la resistencia del microorganismo al tratamiento y la permanencia de la enfermedad, múltiples estudios han propuesto el uso del propóleo como tratamiento contra la otitis canina externa producida por *M. pachydermatis*.

En este proyecto se evaluó la actividad antimicótica de dos propóleos provenientes del Estado de México, uno de Toluca y otro del estado de Morelos, contra cepas clínicas de *M. pachydermatis*. Para ello se utilizaron los extractos etanólicos de los propóleos (EEP), ocho cepas clínicas y una cepa de referencia American Type Culture Collection 14522 (por sus siglas en inglés ATCC) de *M. pachydermatis*. Se realizó la prueba de Inhibición de Crecimiento Radial (ICR) utilizando discos estériles con EEP, a concentraciones de 2, 4, 8, 16 mg/mL, dos pruebas cuantitativas, una para detectar la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM), y la otra para determinar la Concentración Fungicida Mínima (CFM); se realizó también un perfil químico para obtener la cantidad de fenoles y flavonoides totales que contenían los dos propóleos. En la ICR para el EEP de Morelos, se obtuvieron halos de inhibición con un diámetro de 18 mm mayoritariamente, en la concentración de 2mg/mL, y halos de 11 mm de diámetro para el EEP de Toluca

en la misma concentración. En las pruebas cuantitativas se encontró que el propóleo de Morelos presento una CIM promedio de 0.27 mg/mL y el propóleo de Toluca una CIM promedio de 0.44 mg/mL, para la prueba de CFM el propóleo de Morelos presento una CFM promedio de 0.33 mg/mL y el de Toluca una CFM promedio de 1.22 mg/mL. Esto puede indicar que el propóleo de Morelos es más efectivo contra *M. pachydermatis* que el propóleo de Toluca, lo cual se confirma con la cuantificación de fenoles y flavonoides (componentes principales que le confieren actividad biológica al propóleo). El EEP de Morelos presento un valor de 27.64% en fenoles y un valor de 3.56% de flavonoides, y el EEP de Toluca 23.26% de fenoles y 3.47% de flavonoides.

Aunque el resultado obtenido refiere al EEP de Morelos como el más efectivo, ambos propóleos resultan una opción para el tratamiento contra otitis canina externa producida por *M. pachydermatis*.

II. Índice de figuras

Fig.1 Muestra de propóleo (Pérez, 2013). Tomado de https://anamorin.wordpress.com/2013/06/25/usos-delpropoleo-en-medicina-veterinaria/ (Consultada el 01 de diciembre 2016)	15
Fig. 2 Método de recolección de propóleo por raspado con espátula (Universidad Nacional de Colombia, 2009). Tomada de http://agenciadenoticias.unal.edu.co/detalle/article/propoleos-con-gran-potencial-para-el-mercado-colombiano.html . (Consultada el 22 de diciembre 2016)	16
Fig. 3 Método de recolección de propóleo con malla plástica (Pérez, 2011). Obtención del Propóleo. Tomada de http://durangoa.Anunciosya.com.mx/fotos/BXJ7 (Consultada el 22 de diciembre 2016)	17
Fig. 4 Estructura química básica de los flavonoides y de las distintas subfamilias (Álvarez, 2003). Tomada de http://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-actividad-biologica-los-flavonoides-i-13054406 (Consultada el 01 de Octubre 2017)	18
Fig. 5 Estructura de Isoprenos y ejemplos de terpenos (Siari, 2014). Tomada de http://apuntesbioquimicageneral.blogspot.mx/2014/03/lipidos-ivlipidos-insaponificables.html . (Consultada el 01 de Octubre 2017)	19
Fig. 6 Estructuras químicas de los ácidos fenólicos (Gómez, 2012). Tomada de http://www.posgradoeinvestigacion.uadec.mx/CienciaCierta/CC31/5.html (Consultada el 01 de Octubre 2017)	20
Fig. 7 Estructura microscópica de la levadura <i>Malassezia pachydermatis</i> (Rejas, 2004). Tomada de http://dermatologiveterinaria.unileon.es/casos_clinicos/caso_13_respuesta.htm (Consultada el 05 de mayo 2017)	29
Fig. 8 Colonias de <i>Malassezia pachydermatis</i> (Paz K, 2016). Fotografía tomada en Laboratorio 6 de Bioprospección Microbiológica en la Unidad de Investigación Multidisciplinaria, FESC-C4, UNAM.	29
Fig. 9 Anatomía del oído canino (Clínica Veterinaria Velázquez). Tomada de http://clinicaveterinariavelazquez.Com/consejos/cuidados-del-oido-de-tu-mascota/ (Consultada el 02 de Enero 2017).	31
Fig. 10 Oído externo canino con cerumen (Paz K, 2016) Fotografía tomada en Laboratorio 6 de Bioprospección Microbiológica en la Unidad de Investigación Multidisciplinaria, FESC-C4, UNAM.	32
Fig. 11 Cuantificación de fenoles en EEP Morelos y Toluca. Se observa que el EEP de Morelos es más intenso, que el EEP de Toluca (Paz K, 2016). Fotografía tomada en Laboratorio 6 de Bioprospección Microbiológica en la Unidad de Investigación Multidisciplinaria, FESC-C4, UNAM.	50
Fig. 12 Cuantificación de flavonoides en EEP Morelos y Toluca. Se observa que el EEP de Morelos es más intenso, que el EEP de Toluca (Paz K, 2016). Fotografía tomada en Laboratorio 6 de Bioprospección Microbiológica en la Unidad de Investigación Multidisciplinaria, FESC-C4, UNAM.	52
Fig. 13 Activación de cepas clínicas C1 (cepa 1), C2 (cepa 2), C3 (cepa 3) y la cepa de referencia ATCC 14522 de <i>Malassezia pachydermatis</i> (Paz K, 2016). Fotografía tomada en Laboratorio 6 de Bioprospección Microbiológica en la Unidad de Investigación Multidisciplinaria, FESC-C4, UNAM.	53

Fig. 14 Prueba de inhibición de crecimiento radial de <i>Malassezia pachydermatis</i> en agar dextrosa Sabouraud SDA. a) Cepa 4 b) Cepa ATCC 14522 con discos impregnados a concentraciones de 2, 4, 8, 16 mg/mL (Paz K, 2016). Fotografía tomada en Laboratorio 6 de Bioprospección Microbiológica en la Unidad de Investigación Multidisciplinaria, FESC-C4, UNAM.....	54
Fig. 15 Prueba de inhibición de crecimiento radial de <i>Malassezia pachydermatis</i> en agar dextrosa Sabouraud SDA. a) Cepa 4 b) Cepa ATCC 14522 con discos impregnados a concentraciones de 2, 4, 8, 16 mg/mL (Paz K, 2016). Fotografía tomada en Laboratorio 6 de Bioprospección Microbiológica en la Unidad de Investigación Multidisciplinaria, FESC-C4, UNAM.....	55
Fig. 16 Control negativo de la prueba de Inhibición de crecimiento radial, contiene discos impregnados con DMSO y EtOH sin inhibición de <i>Malassezia pachydermatis</i> (Paz K, 2016). Fotografía tomada en Laboratorio 6 de Bioprospección Microbiológica en la Unidad de Investigación Multidisciplinaria, FESC-C4, UNAM.	55
Fig. 17 Estándares de crecimiento negativo (-) sin levadura, (+) positivo con levadura. En el negativo no se observa crecimiento y no presenta turbidez, el positivo presenta crecimiento y turbidez, además de que se observa una capa blanca en la superficie correspondiente a la levadura (Paz K, 2016). Fotografía tomada en Laboratorio 6 de Bioprospección Microbiológica en la Unidad de Investigación Multidisciplinaria, FESC-C4, UNAM.	57
Fig. 18 Prueba de Concentración Inhibitoria Mínima cepa 4, A (0.25mg/mL), B (0.5mg/mL), C (1mg/mL), D (1.5mg/mL), E (3mg/mL), se puede observar que en comparación con los estándares de crecimiento positivo y negativo, el tubo A presentó crecimiento de la levadura (Paz K, 2016). Fotografía tomada en Laboratorio 6 de Bioprospección Microbiológica en la Unidad de Investigación Multidisciplinaria, FESC-C4, UNAM.	58
Fig. 19 Prueba de Concentración Inhibitoria Mínima cepa 7, A (0.25mg/mL), B (0.5mg/mL), C (1mg/mL), D (1.5mg/mL), E (3mg/mL), se puede observar que en comparación con los estándares de crecimiento positivo y negativo, el tubo A y B presentan crecimiento de la levadura al observarse turbios. (Paz K, 2016). Fotografía tomada en Laboratorio 6 de Bioprospección Microbiológica en la Unidad de Investigación Multidisciplinaria, FESC-C4, UNAM.....	59
Fig. 20 Prueba de Concentración fungicida mínima cepa 4, esta cepa presentó crecimiento a la concentración de 0.25 mg/mL, y una inhibición a las concentraciones de 0.5, 1, 1.5 y 3 mg/mL. El estándar de crecimiento positivo también presenta levaduras (Foto Paz K, 2016). Fotografía tomada en Laboratorio 6 de Bioprospección Microbiológica en la Unidad de Investigación Multidisciplinaria, FESC-C4, UNAM.....	60
Fig. 21 Prueba de Concentración fungicida mínima cepa 4, esta cepa presentó crecimiento a la concentración de 0.25 y 0.5 mg/mL, y una inhibición a las concentraciones de, 1, 1.5 y 3 mg/mL. El estándar de crecimiento positivo también presenta levaduras (Paz K, 2016). Fotografía tomada en Laboratorio 6 de Bioprospección Microbiológica en la Unidad de Investigación Multidisciplinaria, FESC-C4, UNAM.	61

III. Índice de tablas

Tabla 1 Sistema de clasificación de causas que favorecen el desarrollo de una otitis canina externa. Tomado de VIRBAC, México S.A de C.V. División animales de compañía Actualización Científica y Tecnología para Médicos Veterinarios....	34
Tabla 2 Signos clínicos de las otitis externas, medias e internas (Goth, 2011)	35
Tabla 3 Medición de absorbancias para la cuantificación de fenoles	48
Tabla 4 Medición de absorbancias para la cuantificación de flavonoides	50
Tabla 5 Medidas de los halos de inhibición producidos por el EEP de Morelos a diferentes concentraciones (2, 4, 8, 16 mg/mL), en 8 cepas clínicas y una cepa ATCC	53
Tabla 6 Medidas de los halos de inhibición producidos por el EEP de Toluca a diferentes concentraciones (2, 4, 8, 16 mg/mL), en 8 cepas clínicas y una cepa ATCC.	54
Tabla 7 Resultados de la prueba de CIM, donde + indica crecimiento y - no crecimiento a diferentes concentraciones 0.25, 0.5, 1, 1.5, 3 mg/mL del EEP. Tomando como referencia a los estándares de crecimiento positivo y negativo...	57
Tabla 8 Resultados de la prueba de CIM, donde + indica crecimiento y - no crecimiento a diferentes concentraciones 0.25, 0.5, 1, 1.5, 3 mg/mL del EEP. Tomando como referencia a los estándares de crecimiento positivo y negativo...	58
Tabla 9 Registros de los resultados obtenidos en la CFM, según la presencia de crecimiento o inhibición de levadura a partir de los tubos de la CIM.....	60
Tabla 10 Tabla 6 Registros de los resultados obtenidos en la CFM, según la presencia de crecimiento o inhibición de levadura a partir de los tubos de la CIM.	61

IV. Índice de gráficas

Gráfica 1 . Curva de calibración para la cuantificación de fenoles	48
Gráfica 2 Curva de calibración para la cuantificación de flavonoides.....	51
Gráfica 3 Se observan las mediciones de los halos de inhibición a las diferentes concentraciones del propóleo, siendo (A) el EEP Morelos y (B) Toluca a 2, 4, 8,16 mg/mL. Se puede observar que el EEP de Morelos presenta una mayor inhibición de la levadura en comparación con el EEP de Toluca. Tras realizar el análisis estadístico de estos resultados, se obtiene que hay una diferencia significativa ($p<0.0001$) entre la inhibición de un propóleo y otro.	56
Gráfica 4 Se observan los resultados comparativos de CIM de ambos propóleos siendo (A) el EEP Morelos y (B) Toluca. El EEP de Morelos presenta una CIM menor que el EEP de Toluca, y tras realizar el análisis estadístico se obtiene que la diferencia si es significativa ($p<0.0001$).....	59
Gráfica 5 Se observan los resultados comparativos de CFM de ambos propóleos siendo (A) el EEP Morelos y (B) Toluca. El EEP de Morelos presenta una CFM menor que el EEP de Toluca, y tras realizar el análisis estadístico se obtiene que la diferencia si es significativa ($p<0.0001$).....	62

V. Glosario de Términos

Abreviatura	Significado
ADN	Ácido desoxirribonucleico
CAPE	Ácido cafeico ester fenetilo
ARN	Ácido ribonucleico
SDA	Agar Dextrosa Sabouraud
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
PEC	Cafeato de feniletilo
MC	Cafeato de metilo
DMBA	Carcinógeno Mamario de Colon
ATCC	Colección de Cultivos Tipo Americano
CFM	Concentración Fungicida Mínima
CIM	Concentración Inhibitoria Mínima
CAE	Conducto Auditivo Externo
GC	Cromatografía de Gases
HPLC	Cromatografía Líquida de Rendimiento Alto
MS	Espectrometría de Masas
EEP	Extracto Etanólico del Propóleo
PEMC	Cafeato dimetil feniletilo
IgG	Inmunoglobulina G
MDBK	Madin - Darby riñón bovino
ODC	Ornitina Descarboxilasa
OEC	Otitis Externa Canina
O ₂	Oxígeno
TPK	Proteína Tirosina Kinasa
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
DMSO	Sulfóxido de dimetilo
ROS	Sustancias Reactivas al Oxígeno
PRV	Virus de pseudorrabia

ÍNDICE

1. Propóleo	14
1.1 Generalidades.....	14
1.2 Historia del propóleo	15
1.3 Método de recolección	16
1.4 Composición química.....	17
1.5 Parámetros físicos y químicos	21
1.6 Actividad biológica	22
1.6.1 Actividad antibacteriana.....	22
1.6.2 Actividad antimicótica	23
1.6.3 Actividad antiparasitaria.....	24
1.6.4 Actividad antiviral.....	25
1.6.5 Actividad antioxidante	25
1.6.6 Actividad antiinflamatoria	26
1.6.7 Actividad antitumoral.....	27
1.7. Efectos adversos.....	27
2. <i>Malassezia pachydermatis</i>	28
2.1 Generalidades.....	28
2.1.2 Características físicas.....	28
2.2 Anatomía canina	30
2.3 Otitis canina externa	33
2.3.1 Definición	33
2.3.2 Etiopatogenia.....	33
2.3.3 Manifestaciones clínicas	35
2.3.4 Diagnóstico	35
2.3.4.1 Examen citológico.....	37
2.3.5 Tratamiento.....	37
2.4 Estudio del propóleo contra <i>Malassezia pachydermatis</i>	38
3. Hipótesis.....	39
4. Objetivo General	40

5. Objetivos particulares	41
6. Justificación.....	42
7. Desarrollo experimental.....	43
8. Metodología.....	44
9. Resultados	48
9.1 Perfil químico	48
9.2 Prueba de sensibilidad cualitativa	52
9.3 Prueba de sensibilidad cuantitativa.....	56
Prueba de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)	56
Prueba de la Concentración Fungicida Mínima (CFM)	60
10. Discusión de resultados	63
11. Conclusiones.....	66
12. Referencias	67

1. Propóleo

1.1 Generalidades

El término *propolis* (Propóleo) significa defensor de la ciudad. Es una resina cerosa, de composición compleja y consistencia viscosa, que las abejas elaboran y utilizan en la construcción, reparación, aislamiento y protección de la colmena (Farré et al., 2004). Además de su función de sellado, y bloqueo de grietas, el propóleo actúa como un antiséptico para prevenir infecciones microbianas de las larvas, las reservas de miel y los panales. Debido a que las poblaciones de abejas son tan confinadas y viven en estrecho contacto, la enfermedad en una abeja puede propagarse rápidamente a toda la colmena. Sin embargo, las colmenas se mantienen sanas porque las abejas fabrican su propio antibiótico, es decir, el propóleo, que reduce el crecimiento microbiano en las paredes de la colmena. Esta sustancia además protege la colmena contra el flujo de aire incontrolado y humedad externa, proporcionando una fina capa impermeable que limita el escape de agua manteniendo la humedad constante dentro de la colmena (Kuropatnicki et al., 2013).

Las abejas (*Apis mellifera*), recogen con sus mandíbulas, partículas resinosas de las yemas, bordes y pecíolos de las hojas de diferentes vegetales (olmo, álamo, sauce, abedul, castaño de Indias, pino, abeto, roble y algunas herbáceas) que, una vez en la colmena, forman el propóleo, cuya producción anual (10-300 g/colmena) difiere en función de la variedad de abejas, el clima, la flora y el dispositivo de recogida. Durante la colecta de propóleos, las abejas mezclan cera y las resinas con una enzima 13- glicosidasa presente en su saliva, provocando la hidrólisis de los flavonoides glicosados en flavonoides agliconas. Posteriormente lo transportan al interior de la colmena, para ser utilizado con los diferentes fines. Debido a la participación de la abeja, la composición del propóleo difiere de las resinas vegetales, pudiendo considerarse, por lo tanto, un producto de origen mixto, vegetal y animal (Lozina et al., 2010). Gracias a su contenido en aceites esenciales, el propóleo suele ser aromático y en función de su origen botánico y de la época de recolección, difiere en color (de amarillo claro a castaño oscuro), sabor (amargo, ligeramente picante o insípido) y consistencia (Farré et al., 2004).

En cuanto a sus propiedades físicas, el propóleo a temperaturas elevadas es blando, flexible y muy pegajoso; sin embargo, cuando se enfría y, en particular, cuando se congela se vuelve duro y quebradizo (*fig.1*). Se vuelve líquido a 60-70°C, pero para algunas muestras el cambio de fase sólida a líquida puede ser tan alto como 100°C (Kuropatnicki et al., 2013).



Fig. 1 Muestra de propóleo (Pérez, 2013). Tomado de <https://anamorin.wordpress.com/2013/06/25/usos-delpropoleo-en-medicina-veterinaria/> (Consultada el 01 de diciembre 2016)

1.2 Historia del propóleo

El propóleo es tan viejo como la miel y ha sido utilizado por el ser humano durante varios siglos. Existen registros que sugieren el uso de este producto por parte de egipcios, persas y romanos. Antiguos egipcios representaban a las abejas que producían propóleos en jarrones y otros adornos y lo utilizaban para aliviar muchos padecimientos. Los antiguos judíos consideraban al tzori (la palabra hebrea para propóleo) como un medicamento. El tzori y sus propiedades terapéuticas se mencionan en todo el Antiguo Testamento.

Se dice que Hipócrates usó propóleo para curar heridas y úlceras, tanto externas como internas. Pedanios Dioscórides, que vivió alrededor de 50 DC, describió los usos médicos del propóleo en su principal obra de materia Médica. Plinio también describe el uso práctico de esta sustancia, según él, el propóleo tiene la propiedad de extraer picaduras y todos los cuerpos extraños de la piel y de disminuir dolores de los tendones. En el siglo I DC, Cornelio Celsus escribió sobre propóleo como un fármaco para promover la supuración, para cerrar heridas y para el tratamiento de abscesos.

En la Edad Media el propóleo no era un tema muy popular y su uso en la medicina tradicional pronto desapareció. Solamente sobrevivieron pocos manuscritos relacionados con el propóleo. Algunas fuentes del siglo XII describen las preparaciones medicinales que se utilizaron para el tratamiento de infecciones orales y faríngeas, así como caries dental.

El interés en el propóleo volvió a Europa junto con la teoría renacentista. Gracias a los médicos humanistas, algunos remedios y tratamientos viejos y olvidados fueron redescubiertos y utilizados de nuevo. El propóleo se encuentra incluido en las farmacopeas de Inglaterra desde el siglo XVII como ingrediente principal de ungüentos de curación (Kuropatnicki et al ., 2013).

1.3 Método de recolección

Aunque existen varios métodos de recolección de este material, se ha utilizado principalmente el método tradicional de raspado y el empleo de mallas plásticas (*Fig 2 y 3*). Generalmente, la recolección por raspado consiste en raspar con palanca o con espátula todos los lugares de la colmena en los cuales las abejas hayan depositado propóleo. Este método resulta inconveniente por la poca productividad y la alta posibilidad de contaminación y oxidación de los compuestos bioactivos en presencia de metales pesados (plomo, hierro y cobre), que pueden provenir de la atmósfera o ser incorporados en la cosecha y la extracción. Por su parte, los propóleos en bruto obtenidos de las mallas, normalmente presentan mejor calidad, con pocas impurezas y libres de contaminantes (Martínez et al., 2012). La recolección se hace antes de la llegada del invierno en las regiones templadas y, en los climas tropicales, al inicio de la estación lluviosa, cuando la propolización parece ser más activa. Tanto en la recolección como en el procesado deben aplicarse rigurosas normas de higiene para evitar la contaminación y la subsiguiente pérdida del valor comercial del producto (Farré et al., 2004).



Fig. 2 Método de recolección de propóleo por raspado con espátula (Universidad Nacional de Colombia, 2009). Tomada de <http://agenciadenoticias.unal.edu.co/detalle/article/propoleos-con-gran-potencial-para-el-mercado-colombiano.html>. (Consultada el 22 de diciembre 2016)



Fig. 3 Método de recolección de propóleo con malla plástica (Pérez, 2011). Obtención del Propóleo. Tomada de <http://durango.anunciosya.com.mx/fotos/BXJ7> (Consultada el 22 de diciembre 2016)

1.4 Composición química

Aunque la composición química del propóleo es susceptible a la ubicación geográfica, origen botánico, y las especies de abejas, un análisis primario de cualquier muestra de propóleos permitirá determinar, en líneas generales, la presencia de cera íntimamente mezclada en proporciones de 20-30%, resinas y bálsamos aromáticos (40- 50%), aceites esenciales (5-10%), polen (4-5%) e impurezas mecánicas (10-30%). Cada región presenta distinta flora, dependiendo de la temperatura, las precipitaciones, el tipo de suelo, la humedad relativa, la insolación y la evapotranspiración, lo que implica una variación en la composición de los propóleos (Lozina et al., 2010).

Con el desarrollo de técnicas de separación y purificación tales como cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), cromatografía en capa fina, cromatografía de gases (GC), así como las técnicas de identificación, tales como espectrometría de masas (MS), y resonancia magnética nuclear (RMN), más compuestos han sido identificados en el propóleo por primera vez, incluyendo flavonoides, terpenos, fenoles y sus ésteres, azúcares, hidrocarburos y elementos minerales. Por el contrario, no se han reportado fitoquímicos relativamente comunes, tales como alcaloides e iridoides.

Flavonoides

Las propiedades antimicrobianas del propóleo pueden ser atribuidas, principalmente, a los flavonoides, como la pinocembrina, galangina, pinobanskina y ácido caféico éster feniletilo (CAPE), el cual es un componente activo del propóleo, que ejerce gran variedad de cambios biológicos en diversos sistemas, como las respuestas inmunomoduladoras, antiinflamatorias, y antimitogénica (Manrique et al., 2008). De acuerdo con la estructura química, los flavonoides en propóleos se clasifican en flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanonol, chalconas, dihidrochalconas, isoflavonas, isodihydroflavones, flavanos, y neoflavonoides (Shuai et al., 2014). Su estructura química se basa en dos anillos fenilo, ligados mediante un anillo pirano, lo cual concluye en un esqueleto de difenilpiranos: C6-C3-C6, común en la mayoría de los flavonoides (Fig. 4).

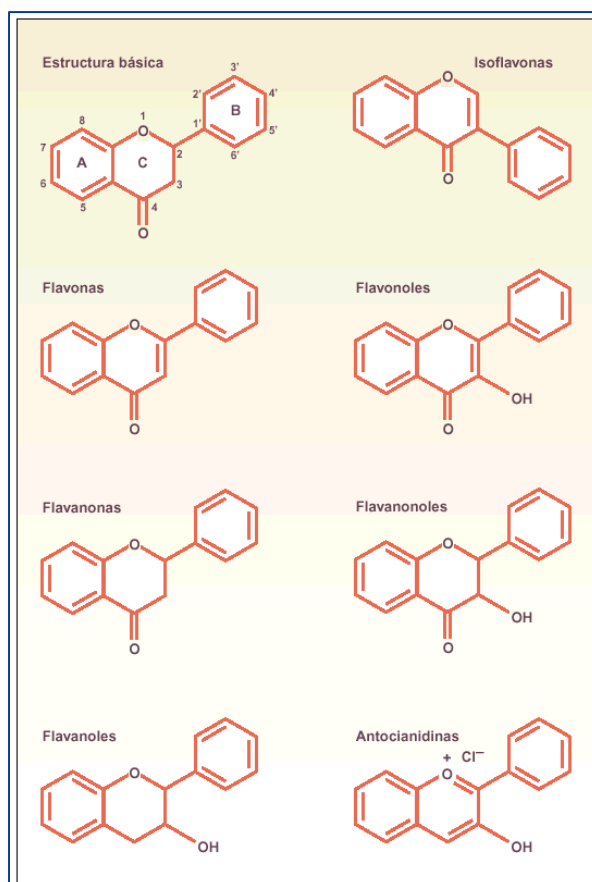


Fig. 4 Estructura química básica de los flavonoides y de las distintas subfamilias (Álvarez, 2003). Tomada de <http://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-actividad-biologica-los-flavonoides-i-13054406> (Consultada el 01 de Octubre 2017)

La gran importancia de los flavonoides radica en su actividad antioxidante, ésta resulta de una combinación de sus propiedades quelatantes de hierro y secuestradoras de radicales libres, además de la inhibición de las oxidasas lipooxigenasa, ciclooxigenasa, mieloperoxidasa y la xantina oxidasa, evitando así la formación de especies reactivas de oxígeno y de hidroxiperóxidos orgánicos. Aunado a esto, se ha visto que también inhiben enzimas involucradas indirectamente en los procesos oxidativos (Escamilla et al., 2009).

Terpenoides

Representan sólo el 10% de los componentes del propóleo, dándole la característica del olor resinoso y contribuyen en la actividad antioxidante y antimicrobiana del propóleo. Los monoterpenos aislados de propóleo incluyen acíclicos, monocíclicos, monoterpenos bicíclicos y sus derivados (Shuai et al., 2014).

Los terpenoides se derivan de la fusión de unidades de cinco carbonos llamada isopreno (C₅) (Fig.5) y se clasifican de acuerdo al número de unidades de isopreno que los formen (Bankova et al., 2000).

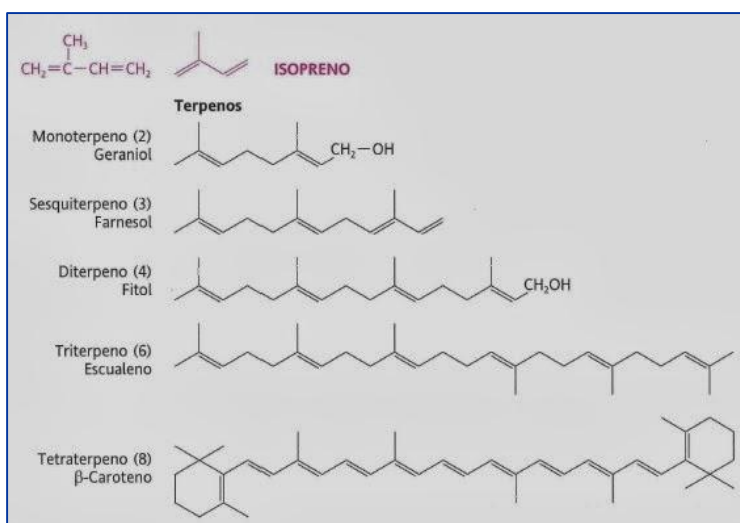


Fig. 5 Estructura de Isoprenos y ejemplos de terpenos (Siari, 2014). Tomada de <http://apuntesbioquimicageneral.blogspot.mx/2014/03/lipidos-ivlipidos-insaponificables.html>. (Consultada el 01 de Octubre 2017)

Compuestos fenólicos

El propóleo contiene fenilpropanoides incluyendo el ácido cinámico, ácido *p*-cumárico, ácido caféico, el ácido ferúlico (*Fig.6*) y sus derivados. Estos componentes tienen una relación estrecha con la actividad antimicrobiana del propóleo.

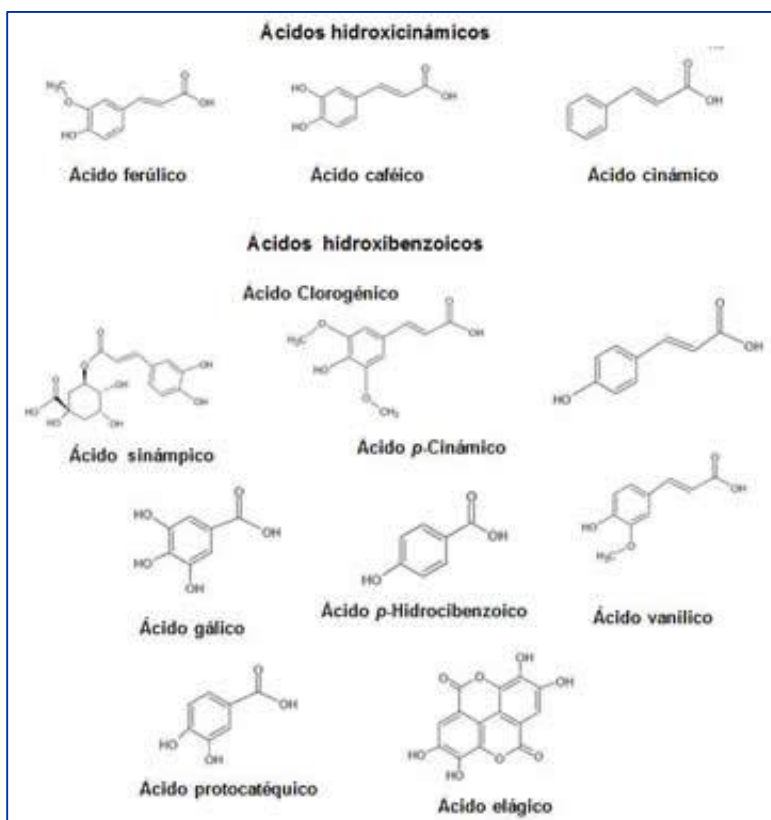


Fig. 6 Estructuras químicas de los ácidos fenólicos (Gómez, 2012). Tomada de <http://www.posgrado.einvestigacion.uadec.mx/CienciaCierta/CC31/5.html> (Consultada el 01 de Octubre 2017)

Azúcares

No hay mucha información de cómo es que se originan los azúcares en el propóleo, se cree que el néctar y la miel son las fuentes de glucosa, fructosa y sacarosa. Otros sugieren que proceden de glucósidos flavonoides hidrolizados en el propóleo, además de algunos mucílago que contienen numerosos azúcares y alcoholes de azúcares que se enumeran entre las potenciales fuentes de azúcar en el propóleo.

Hidrocarburos

Los hidrocarburos son otros componentes básicos del propóleo. En los últimos años, alcanos, alquenos, alcadienos, monoésteres, diésteres, ésteres aromáticos, ácidos grasos y esteroides se han identificado en muchos tipos de propóleos. Estudios revelan que la composición de hidrocarburos solo depende de factores genéticos de las abejas, no de las fuentes vegetales.

Minerales

Elementos traza (Ca, K, Mg, Na, Al, B, Ba, Cr, Fe, Mn, Ni, Sr y Zn) y elementos tóxicos (As, Cd, Hg y Pb) fueron descubiertos por espectrometría de emisión/absorción atómica en muestras de propóleos recolectados de diferentes regiones croatas. Br, Co, Cr, Fe, Rb, Sb, Sm y Zn fueron identificados en diferentes propóleos argentinos por análisis de activación de neutrones. Estos estudios muestran que los perfiles de elementos traza pueden ser útiles para la identificación de propóleos en función de su ubicación (Shuai et al., 2014).

1.5 Parámetros físicos y químicos

- Humedad, materia seca y cenizas: El contenido en agua de un propóleo no debe superar el 5%, para que no se produzcan reacciones que a su vez generen productos no deseados, fermentaciones, crecimiento de levaduras, etc.
- Ceras: La presencia de ceras resta pureza al propóleo. Se consideran propóleos de calidad aquellos en los cuales el porcentaje de ceras no supere el 25%.
- Resinas y Bálsamos: Se define como una resina aquella sustancia orgánica de consistencia pastosa, pegajosa, transparente o translúcida, que se solidifica en contacto con el aire y a un bálsamo como una secreción resinosa que fluye de diversas plantas. El propóleo puede clasificarse como una gomorresina, con presencia de bálsamos. El contenido de estos debe encontrarse dentro del rango (50-60%). Cuanto mayor sea el valor de esta fracción mayor será también la calidad del producto final, ya que aquí se encuentran todos los compuestos con actividad biológica.
- Impurezas mecánicas: Del mismo modo que ocurre con las ceras, las impurezas mecánicas no contienen principios activos y su elevada presencia deprecia el producto. Valores superiores al 25% reflejan la baja pureza del propóleo a estudio.

- Índice de oxidación: Este parámetro nos proporciona una idea de la cantidad de compuestos oxidantes presentes en la muestra. A mayor concentración de este tipo de compuestos menor tiempo de decoloración del propóleo y por lo tanto mejor calidad del producto.
- Fenoles y Flavonoides totales: Los compuestos fenólicos, entre los cuales se incluyen los flavonoides (compuestos farmacológicamente activos), representan un índice inequívoco de la calidad del producto final. Cuanto mayor sea el porcentaje de estas fracciones mayor será también la pureza y calidad del propóleo(Lacalle, 2008).

1.6 Actividad biológica

La actividad biológica del propóleo se asocia principalmente con compuestos fenólicos tales como flavonoides y derivados de ácidos hidroxicinámicos.

La quercentina y otros flavonoides han actuado como agentes antiinflamatorios, para prevenir la formación de placas ateroscleróticas y la agregación plaquetaria, promueven la relajación del músculo liso cardiovascular y muestra actividades antivirales, carcinostáticas, antiulcerosas y anestésicas.

Además de los flavonoides, el propóleo también contiene otros compuestos fenólicos, como los ácidos hidroxicinámicos, como el ácido caféico (ácido 3,4-dihidroxicinámico) que se encuentran en casi todas las plantas y también son potentes agentes antioxidantes, además del (CAPE), otro componente activo del propóleo (De Castro, 2001).

1.6.1 Actividad antibacteriana

La actividad antibacteriana del propóleo es compleja y puede ser atribuida al sinergismo entre algunos de sus compuestos, tales como flavonoides, ácidos aromáticos, ácidos grasos, ésteres, hidroxiácidos, sesquiterpenos y otros compuestos fenólicos presentes en su composición (Manrique A. J., 2011), así como también presenta actividad antimicrobiana el ácido ferúlico y el ácido caféico.

La actividad del propóleo y sus componentes frente a una amplia gama de bacterias ha sido un tema de investigación intensa y se ha encontrado que el propóleo tiene mayor efecto contra las bacterias Gram (+), en menor efecto contra las Gram (-) (De Castro, 2001).

Algunos compuestos ya han sido identificados como principales inhibidores de crecimiento antibacteriano, como el CAPE, la pinocembrina, pinobanksina-3O-etilo y la naringenina, que presentan actividad contra bacterias gram (+) (Velázquez et al., 2007). A nivel molecular se ha demostrado que los compuestos presentes en el propóleo que absorben en la región UV inhiben el ADN dependiente de la ARN polimerasa de *E. coli* y *Streptomyces aureofaciens* (Simuth et al., 1986); los flavonoides robinetina, miricentina y (-) epigalocatequina inhiben síntesis de ADN en *P. vulgaris*, mientras que para *S. aureus* se inhibe la síntesis de ARN (Mori et al., 1987).

Múltiples efectos bacteriostáticos y bactericidas son reportados en la literatura, principalmente el efecto antibacteriano de (-) -galato de epigalocatequina, que modifica la bicapa lipídica, alterando la función de barrera y, en algunos casos, la reducción del espacio intraliposomal causando la fusión de membranas, provocando fuga y agregación de material intramembranoso (Ikigai et al., 1993). La quercetina y naringenina incrementan la permeabilidad y disipan el potencial de la membrana bacteriana (fuerza motriz de protones), disminuyendo la resistencia bacteriana a los antibióticos (Mirzoeva et al., 1997). La pinocembrina, galangina y CAPE causan bacteriólisis parcial, previniendo la división celular, desorganizando el citoplasma y la pared celular, por inhibición de síntesis de proteínas y ARN polimerasa; además, la galangina incrementa la pérdida de potasio en algunas bacterias, degradando la membrana citoplasmática por lisis osmótica (Ntondo et al., 1994).

1.6.2 Actividad antimicótica

Los estudios de la actividad antifúngica del propóleo se han restringido casi exclusivamente al género *Candida*, considerando que los sesquiterpenos, especialmente el bisabolol y flavononas (pinocembrina) son los principales compuestos responsables de esta actividad (Lodoño et al., 2008).

Un trabajo publicado en 2008 describe el uso de un extracto etanólico de propóleo procedente del apiario de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM para probar su actividad antimicótica contra *Candida* y encontraron que se presentó un efecto fungistático a concentraciones de a 0.55 mg/mL y un efecto fungicida en concentraciones de 3 a 7 mg/mL (Quintero et al., 2008).

En Brasil, Freitas y colaboradores evaluaron la actividad antimicótica *in vitro* de un extracto de propóleo a diferentes concentraciones sobre una cepa ATTC90112 de *Cryptococcus neoformans* y demostraron que presentaba actividad fungistática

sobre el crecimiento del hongo en concentraciones que oscilaron desde 0.2 mg/mL – 1.6 mg/mL (Freitas et al., 2007).

En 1999 en Konya, Turquía, se publicó un artículo que describe el uso de extractos de propóleo en concentraciones de 0, 5, 1, 2, 3 y 4 % para inhibir el crecimiento micelial de *A. parasiticus*, *A. niger*, *A. Alternata*, *B. cinérea*, *F oxysporum Melonis* y *P. digitatum* (presentes en alimentos deteriorados, principalmente almacenados). Como resultado encontraron que la concentración más efectiva para inhibir el crecimiento era de 4%, en todas las especies utilizadas. Tras el análisis químico de los extractos de propóleo, encontraron que el ácido caféico, el cumarato de bencilo, la pinobanksina y la pinocembrina eran componentes en común, y los definieron como los responsables de la actividad antimicótica(Özcan, 1999).

En Venezuela se llevó a cabo una investigación donde evaluaron la acción fungistática del propóleo de *Apis mellifera* sobre cepas de *Colletotrichum. gloeosporioides* que afecta frutos de aguacate, papaya y passiflora. Pineda y colaboradores utilizaron propóleos provenientes de la estación de Apicultura Guaremal, realizaron extractos con etanol a diferentes concentraciones (0%, 15%, 20% y 30%) y al realizar las pruebas para evaluar la inhibición del crecimiento encontraron que la mejor concentración fue de 30 %. Así demostraron el efecto supresor del propóleo sobre el crecimiento micelial de *C. gloeosporioides* y le atribuyen el efecto fungistático a la presencia de flavonoides en el extracto (Pineda et al., 2013).

1.6.3 Actividad antiparasitaria

Un estudio reveló que propóleos brasileños presentaron actividad contra *Leishmania braziliensis* en el estudio *in vitro* en donde enfrentaban un extracto hidroalcohólico contra promastigotes de *Leishmania* (dosis que van de 1 a 750 mg/mL) y amastigotes (10, 100, y 250 mg/mL), obtuvieron que el propóleo resultó activo contra los promastigotes, sin embargo, resultó inactivo frente a sus amastigotes (Pontin et al., 2008).

Otro grupo de investigadores evaluó 2 extractos etanólicos de propóleos provenientes de Brasil y Bulgaria contra *Trypanosoma cruzi* y encontraron que los extractos presentaban actividad contra los tripomastigotes, epimastigotes y amastigotes del parásito. Aunque ambos extractos presentaron diferencias notables en su composición debido a la ubicación geográfica, se encontraron compuestos considerados responsables del efecto antiparasitario, tales

compuestos son los ácidos aromáticos, y posiblemente la presencia de amirinas (Salomao et al., 2004).

1.6.4 Actividad antiviral

El propóleo ha mostrado tener un importante efecto para controlar diversos agentes infecciosos incluidos los virus. Un estudio realizado con diferentes propóleos provenientes de variados orígenes geográficos contra el virus de la gripe aviar, mostró que las actividades de todas las muestras resultaron similares a pesar de las diferencias en composición química. Se encontró que los flavonoides y ésteres de ácidos fenólicos son los principales componentes activos contra el virus en la zona templada y aunque las muestras tropicales no contenían las mismas sustancias, presentaban actividades similares (Kujumgiev et al., 1999). En conclusión, este grupo de investigadores propone que el propóleo tiene el efecto farmacológico como una mezcla natural y no como una fuente de compuestos separados.

Otro estudio sobresaliente evaluó la acción antiviral de un extracto etanólico de propóleo (EEP) proveniente del Estado de México, empleando monocapas de células MDBK infectadas con virus de pseudorrabia (PRV) (Soto et al., 2008). Como resultado se obtuvo que el propóleo tiene un uso potencial en la prevención de esta enfermedad viral, ya que por medio de microscopía electrónica se observaron partículas virales con alteraciones ultra-estructurales, además de la presencia de daño sobre las proteínas de la envoltura viral, lo que puede provocar una desestabilización de toda la estructura del virus y, por lo tanto, afectar su capacidad de penetración y el desarrollo de su ciclo replicativo.

1.6.5 Actividad antioxidante

Las reacciones oxido-reductoras constituyen una parte esencial del metabolismo aeróbico en los organismos vivos y ocurren principalmente entre moléculas orgánicas. Debido a estas reacciones, es común que se formen sustancias reactivas al oxígeno (ROS) a manera de intermediarios: oxígeno (O_2) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Sin embargo, el organismo puede sufrir ciertos desequilibrios que conducen a la formación de ROS con actividad de radicales libres, por la transferencia de electrones desapareados, atacando los lípidos de las membranas celulares, modificando proteínas estructurales, así como carbohidratos y ADN.

El propóleo contiene propiedades antioxidantes, específicamente debido a los flavonoides y ácidos fenólicos. La actividad antioxidante se lleva a cabo mediante una transición redox, a través de la cual la molécula antioxidante libera un átomo de hidrógeno que puede ser captado por un radical libre, o permitiendo la formación de ligandos que faciliten la quelación de iones metálicos (Fe^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+}) y la interacción con enzimas. Los flavonoides y ácidos fenólicos tienen la propiedad de interceptar y reaccionar con agentes oxidantes como enzimas, metales y radicales libres.

Diversos compuestos fenólicos como CAPE, galangina y rutina han demostrado tener alta afinidad por atrapar radicales libres y quelar iones metálicos, así como la capacidad para retardar la peroxidación lipídica (Vargas et al., 2014).

1.6.6 Actividad antiinflamatoria

El propóleo ha ido ganando espacios importantes en el tratamiento de heridas por su capacidad antibacteriana, por su notable capacidad cicatrizante y antiinflamatoria.

Strehl, y colaboradores en 1994, estudiaron el efecto antiinflamatorio de un propóleo al evaluar la capacidad inhibitoria del extracto sobre la enzima dihidrofolato reductasa; al ocurrir esto, la producción de interleucinas y prostaglandinas disminuyó. El autor menciona que el ácido caféico presente en el propóleo es el responsable de dicha acción (Strehl et al., 1994).

Otro estudio realizado por Mirzoeva y colaboradores en 1996, de igual forma atribuye la acción antiinflamatoria al ácido caféico (CAPE). Encontraron que este compuesto fue el modulador más potente de la cascada de ácido araquidónico entre los componentes de propóleos examinados, lo que contribuye a la supresión de la vía de la lipoxigenasa del metabolismo del ácido araquidónico durante la inflamación *in vivo*. De igual forma describen la acción del propóleo contra la prostaglandina y la generación de leucotrienos por macrófagos peritoneales (Mirzoeva et al., 1996).

En 1996 Ledón y un grupo de investigadores describe que otros componentes como naftoquinonas, sesquiterpenos y fenoles (eugenol), identificados en el propóleo rojo cubano por espectrometría de masas y cromatografía gaseosa, son capaces de inducir el efecto antiinflamatorio (Ledón et al., 1996).

1.6.7 Actividad antitumoral

La actividad antitumoral del propóleo ha sido estudiada por múltiples científicos y han resaltado su gran efecto frente a diferentes células tumorales; en 1992, científicos sintetizaron tres ésteres del ácido caféico, denominados cafeato de metilo (MC), cafeato de feniletilo (PEC) y cafeato feniletil de dimetilo (PEMC) y estudiaron su actividad frente a DMBA (carcinógeno mamario y de colón), encontrando que se inhibía el crecimiento de células HT-29 de adenocarcinoma de colon, además, encontraron que la ornitina descarboxilasa (ODC), enzima experimentalmente indicadora de la proliferación celular, y proteína tirosina kinasa (TPK), enzima que fosforila restos de tirosina de las proteínas, siendo éste un mecanismo por el cual los factores de crecimiento indican a las células que inicien el crecimiento, estaban igualmente inhibidas.

Wei y colaboradores en 1993, indujeron carcinogénesis química en roedores con acetato de 1-2-0-tetradecanoilforbolilo, posteriormente se les aplicó CAPE a bajas dosis (0.1-6.5 mmol), encontrando que a una concentración de 0.5 mmol de CAPE la explosión metabólica oxidativa de los leucocitos polimorfonucleares disminuye en un 50% y a altas dosis (1-10 mmol), se inhibe la actividad enzimática de ornitina descarboxilasa (ODC), por lo que se inhibe la promoción de crecimiento del tumor (Wei et al., 1993).

1.7. Efectos adversos

La mayoría de los autores no reportan efectos adversos o secundarios con el uso del propóleo, su toxicidad ha sido poco investigada, encontrándose una limitada cantidad de estudios referentes al tema.

Uno de los problemas que ha sido tradicionalmente asociado con el propóleo y del que se hace referencia de forma frecuente, es la alergia que presentan algunas personas y aunque el origen de la alergia es desconocido, diversos casos son los que se han presentado. La respuesta alérgica ha sido documentada presentándose como un enrojecimiento de la piel (en caso del uso directo) y una quemazón o prurito de la misma. En menores casos se ha sospechado que tras el consumo directo del propóleo, se presenta un cuadro diarreico (Sálmon, 2014).

En 2013 Tinoco y colaboradores realizaron un proyecto para evaluar el grado de citotoxicidad *in vitro* que presenta el propóleo sobre leucocitos polimorfonucleares. Utilizando poblaciones celulares de 12,000,000 leucocitos y controles de la población celular inicial, notaron que al utilizar propóleo se disminuyó la viabilidad de las células, resultando repetitivo este resultado en las diferentes muestras cuantificadas, sin haber diferencia a la hora y dos horas de exposición, corroborando con esto que el propóleo presenta una constante toxicidad sobre las células empleadas (Tinoco et al., 2013).

2. *Malassezia pachydermatis*

2.1 Generalidades

Las especies de *Malassezia spp.* forman parte de los hongos comensales en la piel de animales y humanos, son levaduras aerobias, no fermentativas, ureasa positivas que crecen entre 35 y 37°C.

En particular, la especie *Malassezia pachydermatis* es de importancia veterinaria. Es una levadura lipofílica, saprófita, que suele encontrarse en la piel sana de perros y de gatos normales. Puede encontrarse en áreas ricas en glándulas sebáceas. La región anal, el conducto auditivo externo, los labios y la piel interdigital de los perros son frecuentemente colonizados por esta levadura (Quinn et al., 2011).

2.1.2 Características físicas

La levadura es de tamaño pequeño, de forma oval y mide aproximadamente 2-3 µm de ancho y 4-5 µm de largo, su pared celular mide hasta 0.25 µm. Se presenta como células levaduriformes, semiglobosas y/o elipsoidales, que se reproducen en forma asexual mediante brotes unipolares sobre una base ancha, produciendo blastoconidios por gemación monopolar repetida con base larga de unión. Su forma característica en microscopía óptica es llamada “botella de Perrier” o “huella de pie” (Fig. 7)(Chen & B-Hill, 2005).

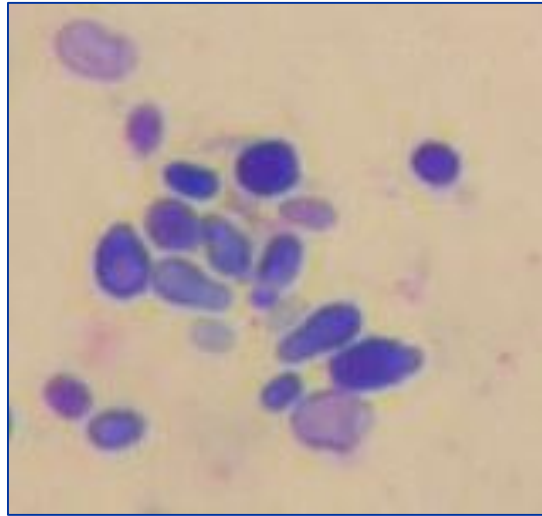


Fig. 7 Estructura microscópica de la levadura *Malassezia pachydermatis* (Rejas, 2004). Tomada de http://dermatologiveterinaria.unileon.es/casos_clínicos/caso_13_respuesta.htm (Consultada el 05 de mayo 2017)

En cultivo se observan colonias elevadas, convexas, pálidas, con superficie lisa de textura suave (*Fig 8*). Esta especie no es lípido dependiente, puede aislarse y mantenerse en medios de cultivo convencionales, por lo que la morfología colonial ha sido descrita en agar dextrosa Sabouraud. Su color es crema, y se han reportado aislamientos rosados (Córdova et al., 2015).



Fig. 8 Colonias de *Malassezia pachydermatis* (Paz K, 2016). Fotografía tomada en Laboratorio 6 de Bioprospección Microbiológica en la Unidad de Investigación Multidisciplinaria, FESC-C4, UNAM.

M. pachydermatis es una de las causas más comunes en la cronificación de las OEC (otitis externa crónica) en perros. En múltiples estudios se hace referencia a esta levadura como el microorganismo mayoritario aislado de casos de otitis crónicas, con porcentajes que llegan al 90%.

La OEC es considerada como una serie de cuadros caracterizados por inflamación recurrente o continua del conducto auditivo externo, durante un periodo igualo superior a 6 meses (Martín et al., 2001).

2.2 Anatomía canina

Los oídos de los perros pueden ser la causa de muchos problemas clínicos, incluyendo hematomas, mordeduras, y algunas infecciones, siendo la infección (otitis externa) la molestia auditiva más frecuente; dicho padecimiento puede producir parálisis facial (Done et al., 2010). De aquí la importancia a conocer la estructura anatómica del oído canino y su función.

El oído es un órgano complejo que cubre dos funciones vitales: oír (percepción del sonido) y el equilibrio (mantenimiento de la posición corporal). Con respecto a la función y basado en la anatomía (*Fig. 9*), el oído se divide en tres partes:

- El oído externo, un receptor de sonidos.
- El oído medio que convierte las ondas sonoras en vibraciones mecánicas.
- El oído interno, en el cual las vibraciones mecánicas son transformadas en impulsos eléctricos reconocidos por el centro de la audición en el cerebro.

Los pabellones auriculares (1) y el conducto auditivo externo (CAE) (2) están formados por el cartílago auricular. Éste comienza en el orificio externo del oído y se enrolla en forma de embudo, transformándose en un túnel a medida que alcanza las porciones inferiores del CAE. El CAE tiene una longitud variable (5-10 cm) y se divide en las porciones vertical y horizontal y continua hasta alcanzar la membrana timpánica, en forma particular de L, que complica la eliminación natural de sustancias anormales del canal auditivo.

El oído medio corresponde a una cavidad llena de aire (caja timpánica) (3), que se encuentra comunicada con la faringe por el tubo auditivo, con el oído externo por la membrana timpánica y con el oído interno por dos aberturas, las ventanas vestibular y coclear (4).

Además del tímpano (5), el oído medio incluye la famosa cadena de huesecillos; martillo (6), yunque (7) y estribo (8).

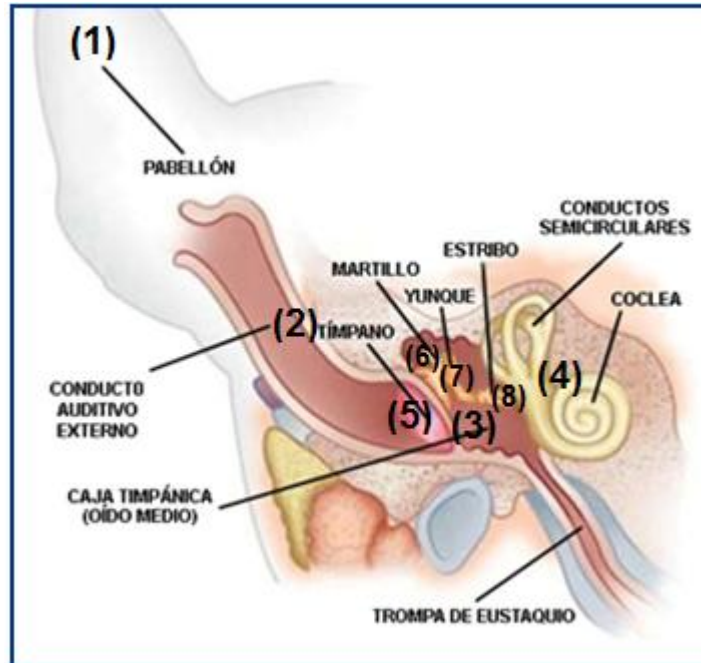


Fig. 9 Anatomía del oído canino (Clínica Veterinaria Velázquez). Tomada de <http://clinicaveterinariavelazquez.com/consejos/cuidados-del-oido-de-tu-mascota/> (Consultada el 02 de Enero 2017).

La piel que recubre el conducto auditivo es una superficie relativamente lisa, tiene una epidermis delgada y una dermis que posee anexos (folículos pilosos y glándulas sebáceas y ceruminosas). Las glándulas sebáceas producen lípidos neutros y las glándulas ceruminosas secretan mucopolisacáridos ácidos y fosfolípidos.

La membrana timpánica es una estructura epitelial que separa el oído externo en forma lateral de la cavidad del oído medio, que está ubicada en posición medial, es de contorno elíptico y varía notablemente de tamaño entre los diferentes animales, pero en promedio mide 15 X 10 mm, es semitransparente y más delgada en el centro en donde se une al cojín cartilaginoso central.

Por su parte el cerumen (*Fig. 10*) es una mezcla de secreción glandular (sebáceas y ceruminosas), corneocitos exfoliados, material intercelular con presencia de inmunoglobulinas A, G y M, la IgG es la que predomina en oídos sanos e inflamados y su concentración relativa exhibe un incremento significativo en los

oídos enfermos. El cerumen, con bacterias, levaduras y restos celulares, se va eliminando hacia el exterior por los movimientos de la epidermis (Lorenzana, 2016).



Fig. 10 Oído externo canino con cerumen (Paz K, 2016) Fotografía tomada en Laboratorio 6 de Bioprospección Microbiológica en la Unidad de Investigación Multidisciplinaria, FESC-C4, UNAM.

Muy importante es el concepto de migración epitelial, que consiste en que, como mecanismo de defensa o auto limpieza, las células epiteliales que tapizan el conducto auditivo externo crecen de forma sincronizada desde dentro hacia fuera, eliminando por arrastre todo el detritus. En la membrana timpánica, el epitelio escamoso simple que la cubre, migra de forma radial, desde el centro hacia la periferia, despegando cualquier acumulación de detritus. Cualquier alteración del epitelio, ya sea por edemas, hiperqueratosis o inflamaciones crónicas, detiene esta migración con consiguiente acumulación de desechos(Goth, 2011).

2.3 Otitis canina externa

2.3.1 Definición

La otitis externa es una inflamación del conducto auditivo externo que se caracteriza por eritema, aumento de la descarga o descamación del epitelio acompañada de dolor y/o irritación (Lozina et al., 2006). Se trata de una enfermedad de etiología multifactorial que afecta a los caninos, y representa entre 5 a 20% de la práctica veterinaria diaria. Esta patología se encuentra asociada mayormente a infecciones causadas por bacterias y levaduras, que muchas veces no responden a los tratamientos con antibióticos (Cole et al., 1998).

La otitis puede ser externa, media e interna. La otitis externa es la más importante y se presenta usualmente asociada a la otitis media. Esta última puede originarse, como en el caso de la otitis externa, por una infección respiratoria o por vía sanguínea. La otitis interna se presenta como una extensión de la otitis media y afecta las funciones vestibular y coclear del oído (Sánchez et al., 2011).

2.3.2 Etiopatogenia

En el curso de las otitis externas, el CAE alterado se vuelve mucho más favorable a la multiplicación de los agentes patógenos. Se observa en particular un estrechamiento de la luz del CAE y una disminución de la migración epitelial fisiológica. Por otra parte, la inflamación favorece la formación de un edema que provoca un exudado, además, las glándulas ceruminosas incrementan su actividad y adoptan un aspecto quístico, que promueve una disminución de la fracción lipídica del cerumen por dilución en las secreciones apócrinas. Todos estos acontecimientos son responsables de un aumento de la humedad en el conducto y una disminución bacteriostática del cerumen. Con este factor todos los agentes patógenos (bacterias, levaduras y parásitos) pueden dañar a los queratinocitos del CAE y favorecer la acumulación de restos en el lumen.

La otitis externa es un signo de muchas enfermedades, no un diagnóstico específico, que tiene diferentes causas. El sistema de clasificación más adecuado las divide en causas predisponentes, primarias y perpetuantes (*Tabla 1*). Muchas otitis crónicas tienen al menos una causa primaria y varios factores perpetuantes y

la falta de reconocimiento y corrección de ellos puede fomentar fracasos terapéuticos (Goth, 2011).

Tabla 1 Sistema de clasificación de causas que favorecen el desarrollo de una otitis canina externa. Tomado de VIRBAC, México S.A de C.V. División animales de compañía Actualización Científica y Tecnología para Médicos Veterinarios.

Factores predisponentes	Factores primarios	Factores perpetuantes
<ul style="list-style-type: none"> • Son factores que alteran el ambiente del conducto auditivo haciendolo más susceptible a infecciones bacterianas y fúngicas . • Por ejemplo: la conformación del pabellón auricular, aumento de la humedad o de la temperatura ambiente, producción excesiva de cerumen, entre otras. 	<ul style="list-style-type: none"> • Son los responsables directos de la otitis. • <u>Parásitos</u>. <i>Otodectes cynotis</i> es la causa parasitaria más frecuente de otitis externa. • <u>Alergias</u>. Después de la atopia, la alergia alimentaria es la segunda reacción de hipersensibilidad que afecta con mayor frecuencia a los oídos. La alergia por contacto puede estar ocasionada por el tipo de fármacos óticos empleados. • <u>Anomalías de queratinización</u>. Hay una hiperqueratosis epidérmica, hiperplasia de las glándulas sebáceas, aumento significativo de los ácidos grasos y la ceras no esterificadas. • <u>Desórdenes endocrinológicos</u>. Endocrinopatías, principalmente hipotiroidismo. • <u>Cuerpos extraños</u>. Materiales vegetales, pelo excesivo en el conducto .auditivo, suciedad, arena, etc. • <u>Otras causas</u>. Desórdenes glandulares, enfermedades autoinmunes, enfermedades virales y neoplasias. 	<ul style="list-style-type: none"> • Son factores que no pueden desencadenar una otitis externa por sí mismos, pero impiden que ésta se cure. • <i>Malassezia</i> (30%) <i>Proteus</i> (10%), <i>Pseudomonas</i> (20%), <i>Staphylococcus coagulasa +</i> (30%), <i>Streptococcus</i> (<5%).

2.3.3 Manifestaciones clínicas

Tabla 2 Signos clínicos de las otitis externas, medias e internas (Goth, 2011)

Otitis externa	Otitis Media	Otitis Interna
<ul style="list-style-type: none">• Sacudidas de la cabeza.• Dolor, prurito y lateralización.• Eritema del pabellón auricular.• Mal olor.• Pelos pegados.• Costras y exudados.	<ul style="list-style-type: none">• Membrana timpánica engrosada, opaca o con cambio de color.• Falta de membrana timpánica y presencia de contenido de ampolla.• Inclinación de la cabeza por afección vestibular.• Sacudidas de la cabeza, deficiencia auditiva, dolor, olor y letargia.	<ul style="list-style-type: none">• Ataxia asimétrica con mantenimiento de la estación.• Inclinación de la cabeza.• Nistagmos horizontal o rotatorio.• Vómitos en estados agudos, con marcha en círculos y caída.

2.3.4 Diagnóstico

Para la evaluación se comienza con la revisión del oído con la ayuda del otoscopio, se debe estirar el pabellón para intentar enderezar el conducto auditivo y llegar a visualizar el fondo del oído. Es necesaria una limpieza previa y un secado absoluto. La acumulación de líquidos puede bloquear la visión en el cono del otoscopio y hará imposible la visualización.

Los principales diagnósticos diferenciales incluyen todas aquellas enfermedades que causan dermatitis pruriginosa eritematosa con seborrea, liquenificación e hiperpigmentación. Entre ellas encontramos las alergias (atopia, alimentaria y por pulgas), pioderma superficial y defectos de la queratinización. Es importante recordar que casi todos estos diagnósticos diferenciales pueden ser la causa desencadenante de la infección con *Malassezia* (Goth, 2011).

En el siguiente diagrama se ejemplifican los pasos a seguir para el diagnóstico y tratamiento de otitis canina.

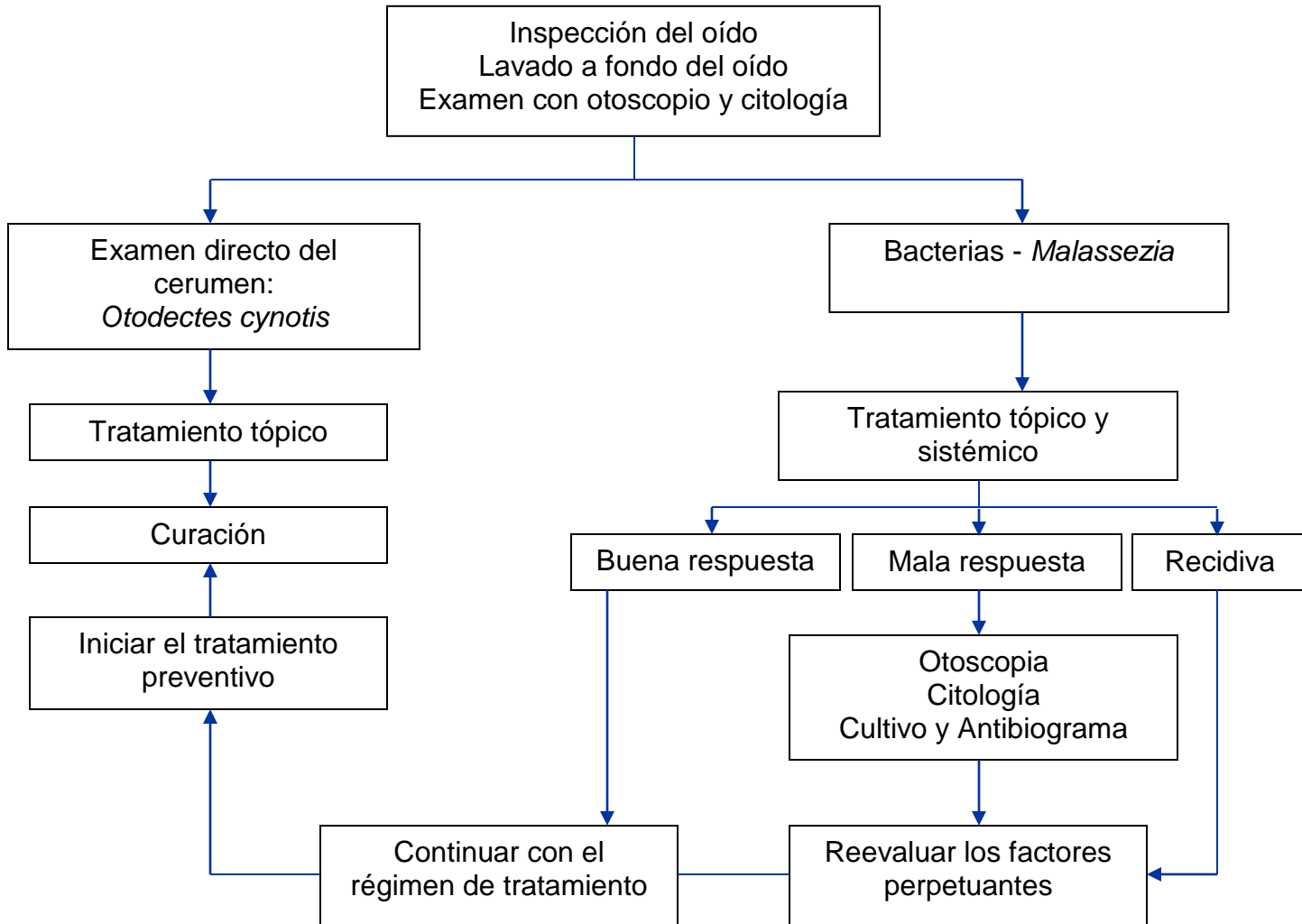


Diagrama 1 . Organigrama para enfoque del diagnóstico y tratamiento de la otitis externa Tomado de VIRBAC, México S.A de C.V. División animales de compañía Actualización Científica y Tecnológica para Médicos Veterinarios

2.3.4.1 Examen citológico

La citología es una herramienta valiosa. Debe realizarse en la clínica en cualquier caso de otitis externa y repetirse como una forma de control del proceso, permitiendo evaluar la respuesta al tratamiento en forma precisa. Varios estudios han demostrado que la citología es más sensible que los cultivos y antibiogramas para detectar la presencia de bacterias y levaduras: su sensibilidad para detectar bacterias Gram (+), bacterias Gram (-) y levaduras es del 84, 100 y 100%, respectivamente. Se recomienda usar el antibiograma solo en casos con presencia de bacterias Gram (-). También se recomienda el uso del cultivo y antibiograma en casos crónicos y recurrentes o cuando se ha obtenido una respuesta al tratamiento inicial.

Se deben tener en cuenta los tres factores (predisponentes, primarios y perpetuantes) al evaluar cada caso. Cualquier caso de otitis externa puede acabar convirtiéndose en un problema de larga duración si no se diagnostica y trata correctamente (Lorenzana, 2016).

2.3.5 Tratamiento

Es fundamental determinar en lo posible los factores confluyentes que causan la otitis. La limpieza ótica a conciencia es necesaria no solo para la inspección, sino también como tratamiento.

La higiene es fundamental para eliminar elementos que cronifican el proceso y hacer que el tratamiento sea efectivo. La importancia de los lavados óticos se basa en la eliminación de exudados que interfieren en la terapia, y en la eliminación de toxinas bacterianas, detritus celulares y ácidos grasos libres que estimulan una posterior inflamación(Goth, 2011).

El tratamiento es necesario en caso de sobrecrecimiento de *Malassezia* para recuperar el equilibrio del ecosistema cutáneo. Los agentes imidazólicos son efectivos frente a *Malassezia*. En casos extensos o resistentes se recomienda emplear itraconazol a 5 mg/kg diarios o ketoconazol a 5-10 mg/kg durante 20 días junto con dos baños terapéuticos semanales. Se han asociado dosis de itraconazol superiores a los 10 mg/kg con vasculitis. El tratamiento tópico es efectivo por sí solo en lesiones recientes y más localizadas. Los champús pueden incluir clorhexidina al 2-4%, miconazol al 2%, enilconazol, diclorofeno y agentes queratolíticos/queratoplásticos.En casos resistentes o recidivantes puede ser necesario el tratamiento regular con champú después de haber suspendido el tratamiento sistémico (Affinity, 2015).

2.4 Estudio del propóleo contra *Malassezia pachydermatis*

Muchos estudios han relacionado la acción antimicótica del propóleo con la búsqueda de nuevos tratamientos contra la otitis canina producida por *Malassezia pachydermatis*. En 2010 Cardoso y colaboradores realizaron una investigación con un extracto de propóleo contra *Staphylococcus coagulasa* positiva y *Malassezia pachydermatis* de otitis canina, mediante la determinación de la Concentración Mínima Bactericida (MBC) (21 mg/mL) y la Concentración Mínima Fungicida (MFC) (5,3 mg/mL), respectivamente y encontraron que el extracto presentaba actividad antimicrobiana y antimicótica contra dichos patógenos (Cardoso et al., 2010).

En el 2006 se determinó la acción de un extracto etanólico de propóleo sobre cepas de *Malassezia pachydermatis* aislado de oídos de caninos con diagnóstico clínico de otitis externa. Se compararon diferentes técnicas de siembra para encontrar la más adecuada, en la determinación de la eficacia del propóleos sobre *Malassezia pachydermatis*. De todas las técnicas empleadas encontraron que la dilución en placa de agar Sabouraud fue la más apropiada (Lozina et al., 2006).

En el 2015 Tovar y colaboradores mencionan algunos usos del propóleo como tratamiento a diversos padecimientos en perros, entre ellos el tratamiento contra la otitis canina producida por *Malassezia pachydermatis*, y define al propóleo como una nueva terapia con efectos benéficos y en parte por su acción antimicótica y en parte por la ventaja de ser más barato que los fármacos utilizados y la ventaja de no presentar efectos secundarios (Tovar et al., 2015).

Otro estudio más actual fue desarrollado por la M.C Nelly Tovar B., quien en 2016 presentó un trabajo de investigación que describe no solo la actividad antifúngica de propóleo contra *Malassezia pachydermatis*, sino también los efectos celulares sobre la morfología y estructura de la levadura. Utilizando un propóleo de la FES Cuautitlán probó su efecto inhibitorio sobre cepas clínicas de *M. pachydermatis*; en las pruebas cuantitativas obtuvo una CIM de 0.15 mg/mL y una MFC de 0.25c mg/mL, para evaluar el daño estructural realizó pruebas con Microscopía óptica (MO) y Microscopía Electrónica de Barrido (MEB). Con la MO pudo observar alteraciones en la forma clásica de la levadura (mejor conocida como huella de zapato), debido a que se pudo observar el cambio a una forma redondeada y algunas levaduras disminuyeron en tamaño. Con la MEB observó cambios estructurales y en el caso de la cepa de referencia, ésta presentó superficies rugosas y ruptura de la superficie celular y las cepas clínicas presentaron poros en la superficie celular y de igual forma superficie rugosa, aún más que en la cepa de referencia (Tovar, 2016).

3. Hipótesis

Si los propóleos mexicanos tienen actividad antimicótica contra *Malassezia pachydermatis*, entonces inhibirán el crecimiento de la levadura.

4. Objetivo General

Evaluar la actividad antimicótica de dos propóleos mexicanos contra cepas clínicas de *Malassezia pachydermatis* mediante pruebas cualitativas y cuantitativas.

5. Objetivos particulares

- Evaluar la actividad antimicótica de los extractos etanólicos de dos propóleos provenientes del Estado de México (Toluca y Morelos).
- Determinar la concentración de fenoles y flavonoides en los extractos etanólicos mediante pruebas químicas establecidas en la NOM-003-SAG/GAN-2017 (Propóleos, producción y especificaciones para su procesamiento).
- Realizar una prueba cualitativa: Inhibición de crecimiento radial, mediante el uso de discos impregnados con propóleo a diferentes concentraciones (2, 4, 8, 16 mg/mL), para observar la inhibición del crecimiento de la levadura en presencia del propóleo.
- Realizar pruebas de sensibilidad cuantitativa como:
 - Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)
 - Concentración Fungicida Mínima (CFM)

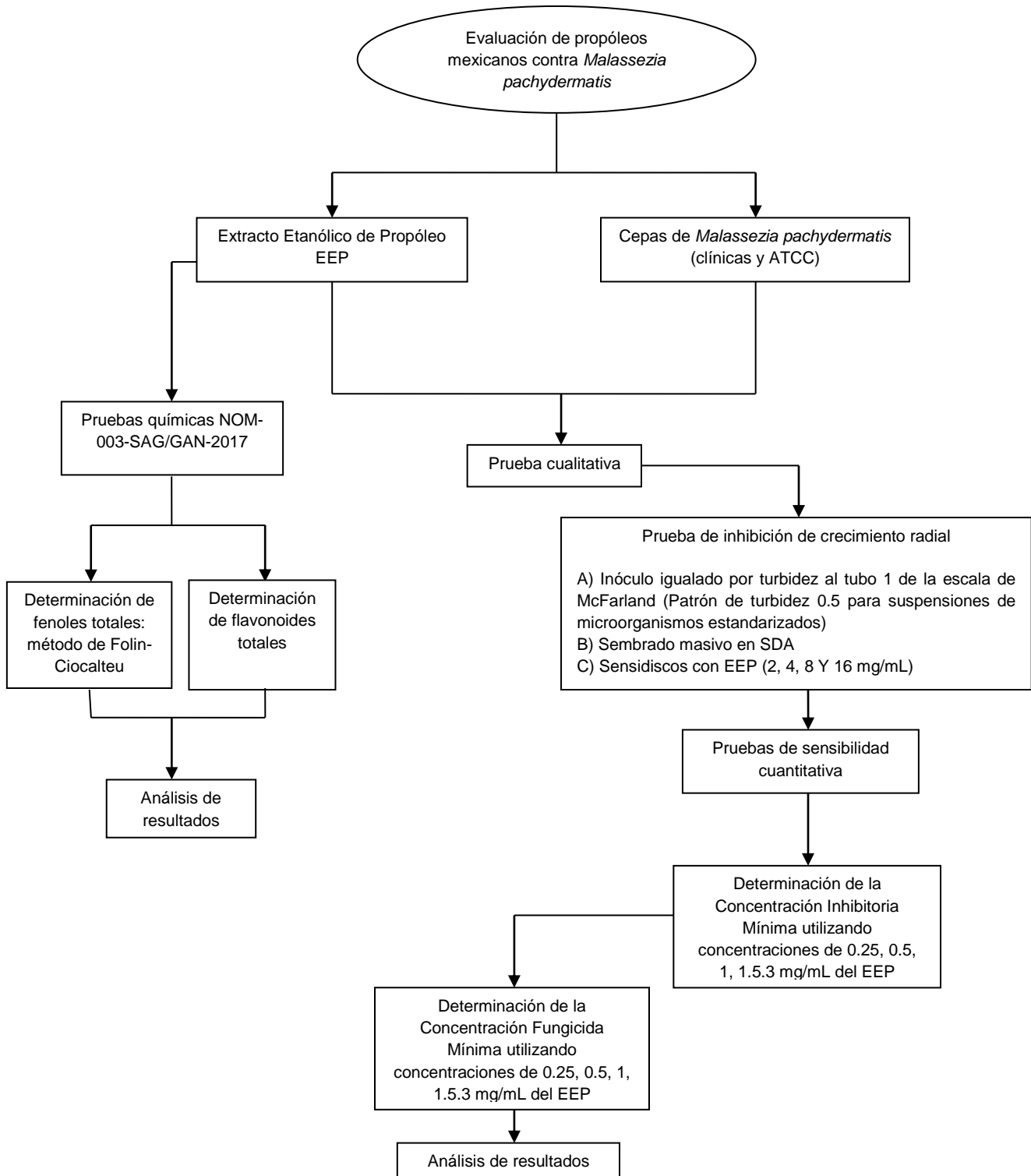
6. Justificación

Una problemática importante en el tratamiento de la otitis canina es el uso de muchos fármacos que garanticen la disminución de todos los agentes patógenos y la sintomatología de la enfermedad. Esto conduce a recurrir no solo a antimicóticos, sino también a utilizar antibióticos, antiinflamatorios y acaricidas.

Es por eso que la propuesta a utilizar componentes naturales con un amplio espectro terapéutico, como es el caso del propóleo, resulta ser una buena opción con menos efectos secundarios y menor costo para el tratamiento de la otitis canina producida por *Malassezia pachydermatis*.

Debido a esto, se propone este proyecto con la finalidad de demostrar la actividad antimicótica de dos propóleos mexicanos (Morelos y Toluca) contra *Malassezia pachydermatis* y con ello tener más alternativas naturales para el tratamiento de la otitis canina.

7. Desarrollo experimental



8. Metodología

- **Microorganismo utilizado**

Se utilizaron 8 cepas clínicas y 1 cepa de referencia ATCC 14522 de *Malassezia pachydermatis*. Éstas fueron proporcionadas por la Maestra en Ciencias Nelly T. B.

Para la conservación de las levaduras se mantuvieron en Caldo Dixon a una temperatura de 33°C.

- **Extracto etanólico de propóleo**

Se utilizaron 2 EEP, uno proveniente del estado de Morelos y otro de Toluca, ambos fueron proporcionados por el Dr. Tonatiuh A. Cruz Sánchez.

- **Determinación de fenoles totales.**

La concentración de fenoles totales (CFT) se midió por espectrofotometría de absorción UV-VIS con base a una reacción colorimétrica de óxido-reducción; para ello, el agente oxidante que se utiliza es el reactivo de Folin-Ciocalteu (FC), $3\text{H}_2\text{O} \cdot \text{P}_2\text{O}_5 \cdot \text{I}_3\text{WO}_3 \cdot 5\text{MoO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (mezcla de ácido fosfotúngstico/fosfomolibdico hexavalente). Se realizó una curva de calibración de ácido gálico con las concentraciones de: 0.00625, 0.0125, 0.025, 0.05, 0.1 y 0.2 mg/mL. La solución estándar que se utilizó para cada extracto de propóleo fue de 0.02 mg/mL y las absorbancias se interpolaron con la curva para obtener la concentración de fenoles de cada propóleo.

- **Cuantificación de flavonoides.**

La concentración de flavonoides se determinó por el método colorimétrico de cloruro aluminio (AlCl_3) que forma complejos estables de ácidos con el grupo cetona en C-4 y, o bien el grupo hidroxilo en C-3 ó C-5 de flavonas y flavonoles. Además, forma complejos lábiles ácidos con los grupos *orto*-dihidroxilo en el anillo A o B de los flavonoides. Se realizó una curva de calibración de quercetina con concentraciones de 1 a 90 mg/ L, y un estándar de cada extracto de propóleo de 0.02 mg/mL y las absorbancias se interpolaron con la curva de calibración para obtener la concentración de los flavonoides.

- **Prueba de sensibilidad cualitativa**

Prueba de inhibición de crecimiento radial

1) Activación de las cepas clínicas y ATCC 14522

Se sembraron las cepas en Agar Dextrosa Sabouraud (SDA), a partir del caldo de Dixon en donde se encontraban, y se incubaron a 33°C durante 72 horas.

2) Preparación de los discos

Se utilizaron discos estériles de papel filtro Whatman no. 5 de 5mm de diámetro impregnados con 10µl de EEP a diferentes concentraciones (2, 4, 8 y 16 mg/mL) y se dejaron secar a temperatura ambiente.

Del agar SDA se tomó un inóculo de la cepa y se colocó en un tubo con solución salina, se igualó al tubo No.1 de Mc Farland¹, y se realizó un sembrado masivo sobre cajas con SDA, se le colocaron 4 discos con EEP a diferentes concentraciones (2, 4, 8 y 16 mg/mL) y se incubó a 33° C durante 72 horas.

Para evitar falsos positivos, se realizaron controles utilizando 2 discos impregnados con DMSO y con etanol, éstos se colocaron en una caja de Petri con SDA y levadura.

Pasadas 72 horas después se midieron los halos de inhibición con Vernier.

- **Prueba de sensibilidad cuantitativa**

Prueba de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)

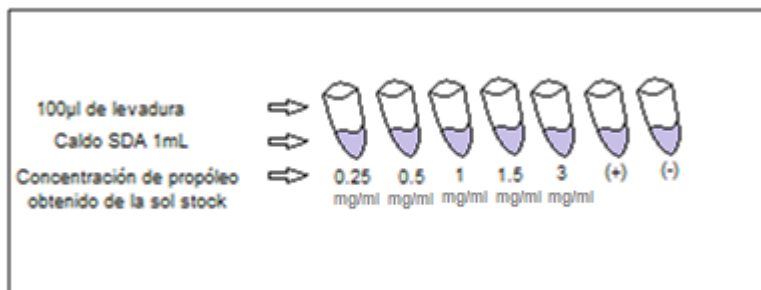
Para la CIM se utilizaron 7 tubos por cada cepa, 5 tubos contenían las diferentes concentraciones de propóleo (0.25, 0.5, 1, 1.5 y 3 mg/mL) y 2 contenían estándares de crecimiento para observar la presencia o ausencia de la levadura. Este procedimiento se realizó con todas las cepas debido a que todas presentaron inhibición en la prueba cualitativa.

Se preparó una solución stock de propóleo con DMSO, para que, a partir de ésta, se obtuvieran las alícuotas que se utilizaron en la prueba cuantitativa.

Después de que las cepas fueron activadas, se prepararon tubos con solución salina y levadura, posteriormente se igualaron al tubo No.1 de Mc Farland¹, para poder obtener las cepas en suspensión.

¹En Microbiología, los estándares de McFarland son usados como una referencia para ajustar la turbidez de suspensiones microbiológicas hasta que el número de colonias llegue al rango establecido, específicamente para identificación y pruebas de susceptibilidad. El patrón de McFarland más utilizado es al 0.5% y corresponde aproximadamente a una suspensión homogénea de 1.5×10^8 células bacterianas por mL (Científica, 2017).

Los 7 tubos se prepararon de la siguiente manera:



Se agregaron 100 µL de levadura a concentración de 1.5×10^8 células bacterianas por mL, 1 mL de caldo SDA y las diferentes concentraciones del EEP obtenido de la solución stock (0.25, 0.5, 1, 1.5 y 3 mg /mL) a los 5 primeros tubos.

El estándar de crecimiento positivo contenía 100µLde levadura y 1mL de caldo SDA, y el estándar de crecimiento negativo contenía solamente caldo SDA.

Posteriormente se incubaron todos los tubos a 33°C durante 72 horas.

Se reportaron los resultados obtenidos, bajo la observación de la ausencia o presencia de crecimiento de levadura, tomando como base los estándares de crecimiento positivos y negativos de cada cepa.

- **Prueba de la Concentración Fungicida Mínima (CFM)**

Se realizó en todas las diluciones de la CIM, ya que la turbidez que produce el propóleo impide tomar una lectura exacta de la misma.

La CFM debe montarse a partir del tubo que tiene crecimiento mínimo (se determina por grado de turbidez: turbio-crecimiento, sin turbidez-sin crecimiento) y de tres siguientes de inhibición completa.

Se prepararon cajas con agar SDA, se sembraron tomando 10 µl de cada tubo de la CIM incluyendo los estándares de crecimiento positivo y negativo.

Se incubaron todas las cajas a 33°C durante 72 horas.

La determinación de la CIM y la CFM se realizó con base a lo establecido por el CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), que indica:

Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A)

a) Método de microdilución para levaduras (M27-A3)

Para los **antifúngicos fungistáticos**, la CIM es la concentración más baja de antifúngico que produce una reducción aparente del crecimiento de la levadura ($\geq 50\%$), comparada con el crecimiento control.

Para los **antifúngicos fungicidas**, la CIM es la concentración más baja de antifúngico que inhibe el crecimiento de la levadura, o lo que es lo mismo, que produce una reducción del 100% del crecimiento.

Determinación de la CFM, se obtiene a partir de la CIM; de acuerdo con el CLSI, debe haber menos de tres colonias para ser considerada como CFM.

b) Método de difusión en disco M44-A

Es un estudio de susceptibilidad por difusión en disco (Kirby Bauer). Un disco que tiene una cantidad específica (no concentración) de antimicrobiano, es aplicado a una superficie de agar inoculado con un microorganismo. El antimicrobiano difunde desde el disco al medio de cultivo produciendo una zona de inhibición en la cual una concentración crítica de antimicrobiano inhibe el crecimiento bacteriano. La zona de inhibición es medida y se relaciona inversamente con la CIM.

Para la levadura es el mismo método, basado en el estudio a la sensibilidad de los antifúngicos en función del halo de inhibición producido.

- **Análisis estadístico**

Se realizó un análisis estadístico para comparar los efectos de cada propóleo; para ello, se utilizó el paquete estadístico GraphPadPrism 5 Project, One-way ANOVA and t-test Versión 5.01, 2007.

Nota: esta metodología se realizó por cada EEP (Toluca y Morelos).

9. Resultados

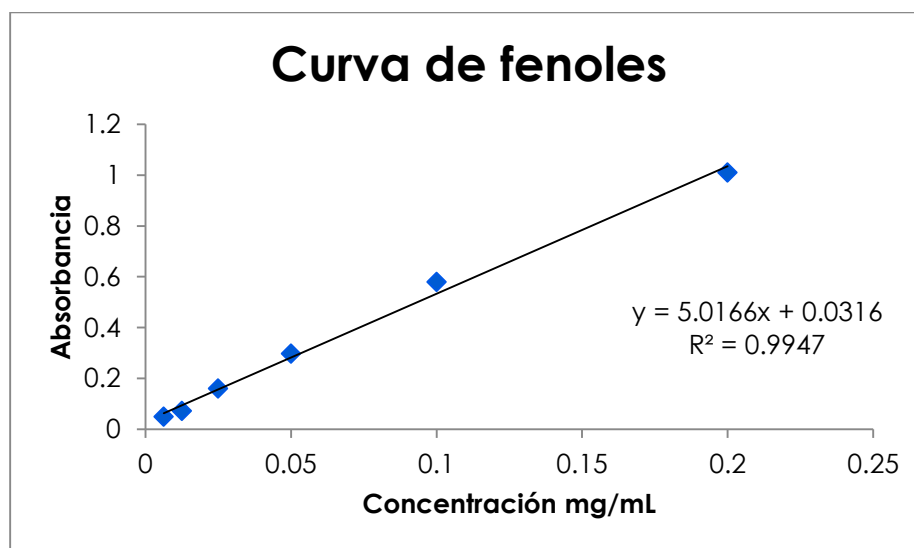
9.1 Pruebas químicas NOM-003-SAG/GAN-2017

A) Cuantificación de fenoles totales.

Tabla 3 Medición de absorbancias para la cuantificación de fenoles

Concentración mg/mL	Absorbancia
0.00625	0.048
0.0125	0.071
0.025	0.16
0.05	0.297
0.1	0.579
0.2	0.579
EEP Morelos	<u>27.64%</u>
EEP Toluca	<u>23.26%</u>

La representación de los valores de absorbancia obtenidos, y la ecuación de la recta se presentan en la Gráfica 1.



Gráfica 1 . Curva de calibración para la cuantificación de fenoles

Para determinar la cantidad de fenoles en cada EEP se utiliza la ecuación de la recta, obteniendo así un valor de 27.64 % de fenoles totales en el EEP de Morelos, y 23.26% de fenoles totales en el EEP de Toluca.

Ecuación de la recta:

$$y = 5.016x + 0.031$$

- Sustituir valores de absorbancia en ecuación de la recta

$$0.1 = 5.016x + 0.031$$

$$X = \frac{0.1 - 0.031}{5.016}$$

$$X = 0.01375 \text{ mg/mL}$$

$$\text{Abs}_1: 0.1 \longrightarrow X = 0.01375 \text{ mg/mL}$$

$$\text{Abs}_2: 0.105 \longrightarrow X = 0.01475 \text{ mg/mL}$$

$$\text{Abs}_3: 0.096 \longrightarrow X = 0.01295 \text{ mg/mL}$$

- Se obtiene el promedio de los tres valores obtenidos

$$0.01382 \text{ mg/mL de fenoles}$$

- Y con ello los equivalentes en AG/g EEP

$$\frac{0.01382 \times 100}{1.382 / 0.05}$$

- En porcentaje = 27.64 % EEP Morelos
23.26 % EEP Toluca

La presencia de fenoles se observa en una tonalidad café (Fig. 11); El EEP de Morelos presenta una tonalidad café más intensa que el EEP de Toluca.



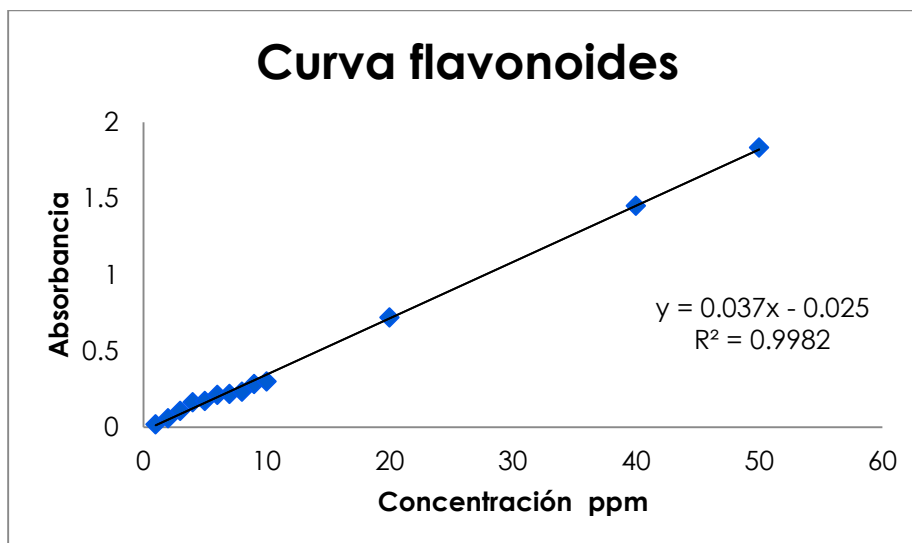
Fig. 11 Cuantificación de fenoles en EEP Morelos y Toluca. Se observa que el EEP de Morelos es más intenso, que el EEP de Toluca (Paz K, 2016). Fotografía tomada en Laboratorio 6 de Bioprospección Microbiológica en la Unidad de Investigación Multidisciplinaria, FESC-C4, UNAM.

B) Cuantificación de flavonoides totales.

Tabla 4 Medición de absorbancias para la cuantificación de flavonoides

Concentración ppm	Absorbancia
1	0.019
2	0.059
3	0.106
4	0.164
5	0.172
6	0.211
7	0.219
8	0.233
9	0.283
10	0.3
20	0.719
40	1.452
50	1.835
EEP Morelos	<u>3.56 %</u>
EEP Toluca	<u>3.47 %</u>

La representación de los valores de absorbancia para flavonoides obtenidos, y la ecuación de la recta se presentan en la gráfica 2.



Gráfica 2 Curva de calibración para la cuantificación de flavonoides

Para determinar la cantidad de flavonoides en cada EEP se utiliza la ecuación de la recta, obteniendo así un valor de 3.56 % de flavonoides totales en el EEP de Morelos, y 3.47 % de flavonoides totales en el EEP de Toluca.

Ecuación de la recta:

$$y = 0.037x - 0.025$$

- Sustituir valores de absorbancia en ecuación de la recta

$$0.042 = 0.037x - 0.025$$

$$X = \frac{0.042 + 0.025}{0.037}$$

$$X = 1.81081 \text{ ppm}$$

$$\text{Abs}_1: 0.042 \longrightarrow X = 1.81081 \text{ ppm}$$

$$\text{Abs}_2: 0.046 \longrightarrow X = 1.91891 \text{ ppm}$$

$$\text{Abs}_3: 0.035 \longrightarrow X = 1.62162 \text{ ppm}$$

- Se obtiene el promedio de los tres valores obtenidos

$$1.78378 \text{ ppm de flavonoides}$$

- Para obtener los miligramos por mL

$$\begin{aligned} & 1.78378 \text{ ppm} / 1000 \\ & 0.00178378 \text{ mg/mL} \times 100 \\ & 0.1783 / 0.05 \end{aligned}$$

- En porcentaje = 3.56 % EEP Morelos
3.47 % EEP Toluca

La concentración de flavonoides se observa en una tonalidad ámbar (Fig. 12); El EEP de Morelos presenta una tonalidad ámbar más intensa que el EEP de Toluca.



Fig. 12 Cuantificación de flavonoides en EEP Morelos y Toluca. Se observa que el EEP de Morelos es más intenso, que el EEP de Toluca (Paz K, 2016). Fotografía tomada en Laboratorio 6 de Bioprospección Microbiológica en la Unidad de Investigación Multidisciplinaria, FESC-C4, UNAM.

9.2 Prueba de sensibilidad cualitativa

A) Prueba de inhibición de crecimiento radial

Para determinar el crecimiento óptimo de las levaduras, se sembraron las 8 cepas clínicas y la cepa ATCC 14522 en medios SDA durante 72 hrs. a 33° C. Bajo estas condiciones fue posible obtener colonias bien definidas de *Malassezia pachydermatis* (Fig.13).

Es importante mencionar que de todo el material fotográfico que evidencia el efecto antimicótico de los EEP sobre las 8 cepas clínicas y la cepa ATCC 14522,

en las pruebas microbiológicas (ICR, CIM y CFM), fueron únicamente utilizadas las imágenes de aquellas cepas que mejor representaron los resultados.

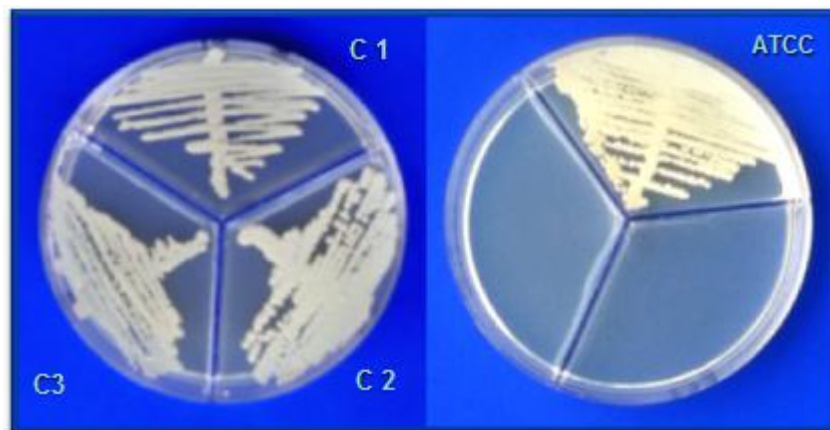


Fig. 13 Activación de cepas clínicas C1 (cepa 1), C2 (cepa 2), C3 (cepa 3) y la cepa de referencia ATCC 14522 de *Malassezia pachydermatis* (Paz K, 2016). Fotografía tomada en Laboratorio 6 de Bioprospección Microbiológica en la Unidad de Investigación Multidisciplinaria, FESC-C4, UNAM.

Una vez obtenidas las colonias se realizó un sembrado masivo y se colocaron los discos con EEP a las concentraciones 2, 4, 8, 16 mg/mL. Posterior a la incubación a 33 °C por 72 horas, se midieron los halos de inhibición producidos por los dos propóleos, (*Tabla 5*) con la ayuda de un vernier.

- Propóleo 1. Morelos

Tabla 5 Medidas de los halos de inhibición producidos por el EEP de Morelos a diferentes concentraciones (2, 4, 8, 16 mg/mL), en 8 cepas clínicas y una cepa ATCC 14522

Cepa	2 mg/mL	4 mg/ mL	8 mg/mL	16 mg/mL
1	14 mm	15 mm	17 mm	18 mm
2	16 mm	18 mm	19 mm	20 mm
3	18 mm	20 mm	24 mm	25 mm
4	12 mm	14 mm	15 mm	16 mm
5	18 mm	20 mm	24 mm	23 mm
6	13 mm	14 mm	18 mm	20 mm
7	18 mm	23 mm	25 mm	25 mm
8	12 mm	13 mm	15 mm	15 mm
ATCC 14522	13 mm	15 mm	16 mm	16 mm

Los halos de inhibición se observan bien definidos en cada concentración (Fig. 14).

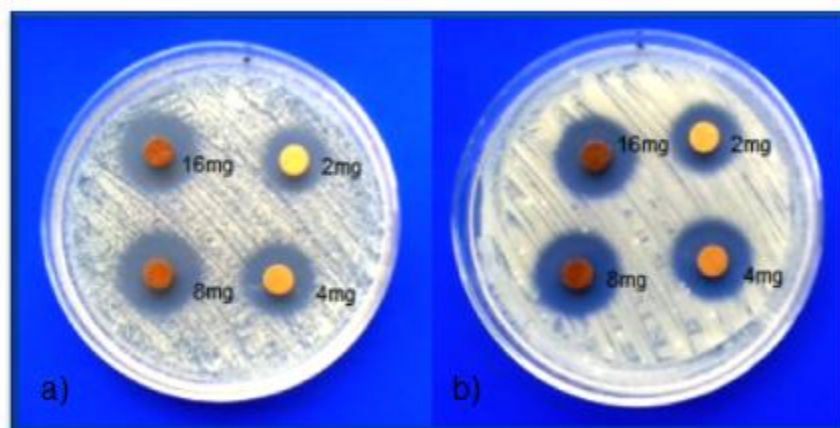


Fig. 14 Prueba de inhibición de crecimiento radial de *Malassezia pachydermatis* en agar dextrosa Sabouraud SDA. a) Ceba 4 b) Ceba ATCC 14522 con discos impregnados a concentraciones de 2, 4, 8, 16 mg/mL (Paz K, 2016). Fotografía tomada en Laboratorio 6 de Bioprospección Microbiológica en la Unidad de Investigación Multidisciplinaria, FESC-C4, UNAM.

- Propóleo 2. Toluca

Tabla 6 Medidas de los halos de inhibición producidos por el EEP de Toluca a diferentes concentraciones (2, 4, 8, 16 mg/mL), en 8 cepas clínicas y una cepa ATCC 14522.

Cepa	2 mg/mL	4 mg/mL	8 mg/mL	16 mg/mL
1	12 mm	13 mm	15 mm	18 mm
2	11 mm	12 mm	14 mm	17 mm
3	15 mm	16 mm	18 mm	20 mm
4	11 mm	13 mm	14 mm	14 mm
5	14 mm	16 mm	20 mm	23 mm
6	11 mm	13 mm	15 mm	17 mm
7	11 mm	12 mm	12 mm	14 mm
8	10 mm	13 mm	14 mm	17 mm
ATCC 14522	12 mm	14 mm	14 mm	15 mm

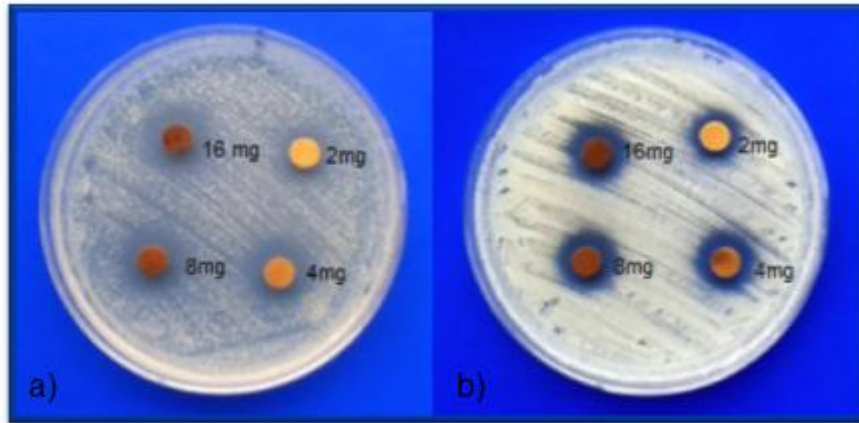


Fig. 15 Prueba de inhibición de crecimiento radial de *Malassezia pachydermatis* en agar dextrosa Sabouraud SDA. a) Cepa 4 b) Cepa ATCC 14522 con discos impregnados a concentraciones de 2, 4, 8, 16 mg/mL (Paz K, 2016). Fotografía tomada en Laboratorio 6 de Bioprospección Microbiológica en la Unidad de Investigación Multidisciplinaria, FESC-C4, UNAM.

Para asegurar que el efecto inhibitorio es producido por el propóleo y no por los diluyentes, se realizó un control negativo usando discos impregnados con sulfóxido de dimetilo (DMSO) y etanol (EtOH), posteriormente se pudo observar que no hay inhibición de la levadura (Fig. 16).

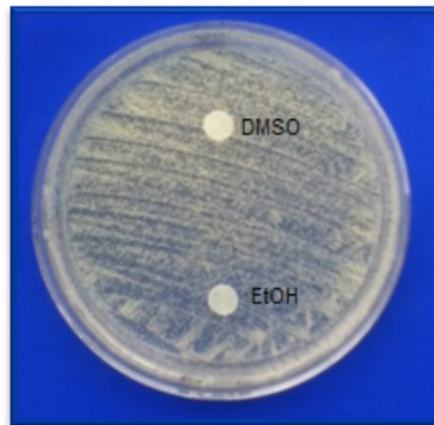
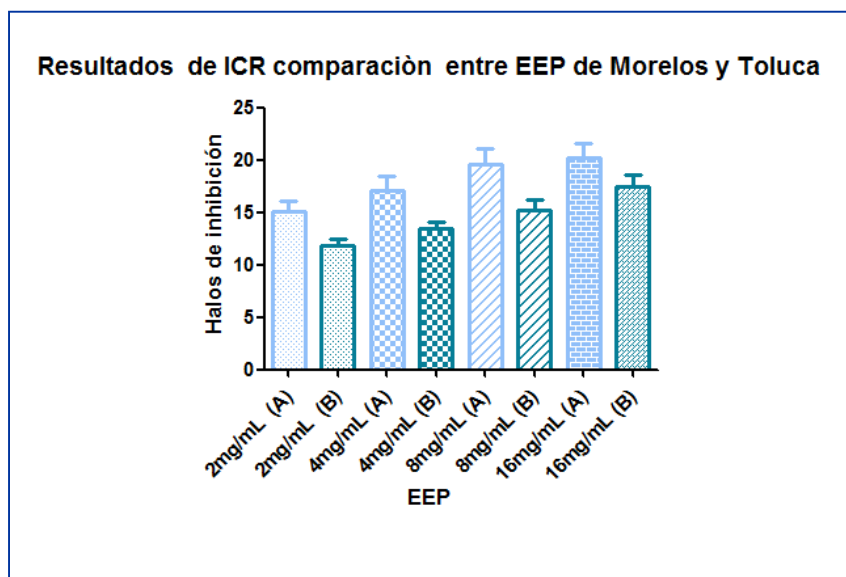


Fig. 16 Control negativo de la prueba de Inhibición de crecimiento radial, contiene discos impregnados con DMSO y EtOH sin inhibición de *Malassezia pachydermatis* (Paz K, 2016). Fotografía tomada en Laboratorio 6 de Bioprospección Microbiológica en la Unidad de Investigación Multidisciplinaria, FESC-C4, UNAM.

Al realizarse el análisis estadístico se encontró que existe una diferencia significativa ($p < 0.0001$) entre los halos de inhibición producidos por el propóleo de Morelos y el propóleo de Toluca sobre *Malassezia pachydermatis* (Gráfica 3).



Gráfica 3 Se observan las mediciones de los halos de inhibición a las diferentes concentraciones del propóleo, siendo (A) el EEP Morelos y (B) Toluca a 2, 4, 8, 16 mg/mL. Se puede observar que el EEP de Morelos presenta una mayor inhibición de la levadura en comparación con el EEP de Toluca. Tras realizar el análisis estadístico de estos resultados, se obtiene que hay una diferencia significativa ($p < 0.0001$) entre la inhibición de un propóleo y otro.

9.3 Prueba de sensibilidad cuantitativa

Prueba de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)

Se determinó mediante el grado de turbidez y la detección de crecimiento de la levadura en los tubos, tomando como referencia los estándares de crecimiento positivo y negativo (Fig. 17).

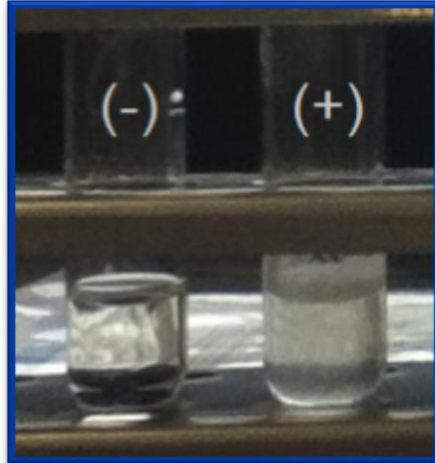


Fig. 17 Estándares de crecimiento negativo (-) sin levadura, (+) positivo con levadura. En el negativo no se observa crecimiento y no presenta turbidez, el positivo presenta crecimiento y turbidez, además de que se observa una capa blanca en la superficie correspondiente a la levadura (Paz K, 2016). Fotografía tomada en Laboratorio 6 de Bioprospección Microbiológica en la Unidad de Investigación Multidisciplinaria, FESC-C4, UNAM.

- Propóleo 1. Morelos

Tabla 7 Resultados de la prueba de CIM, donde + indica crecimiento y - no crecimiento a diferentes concentraciones 0.25, 0.5, 1, 1.5, 3 mg/mL del EEP. Tomando como referencia a los estándares de crecimiento positivo y negativo.

Cepa	0.25 mg/mL	0.5 mg/mL	1 mg/mL	1.5 mg/mL	3 mg/mL	Estándar (+)	Estándar (-)
1	-	-	-	-	-	+	-
2	-	-	-	-	-	+	-
3	+	-	-	-	-	+	-
4	+	-	-	-	-	+	-
5	-	-	-	-	-	+	-
6	-	-	-	-	-	+	-
7	+	-	-	-	-	+	-
8	+	-	-	-	-	+	-
ATCC 14522	+	+	-	-	-	+	-

Se obtuvieron los resultados una vez que fueron comparados con los estándares de crecimiento positivo y negativo (*Fig. 17*), observándose como positivo los tubos que presentaron una película color crema en la superficie (correspondiente a la levadura), (*Fig. 18*).

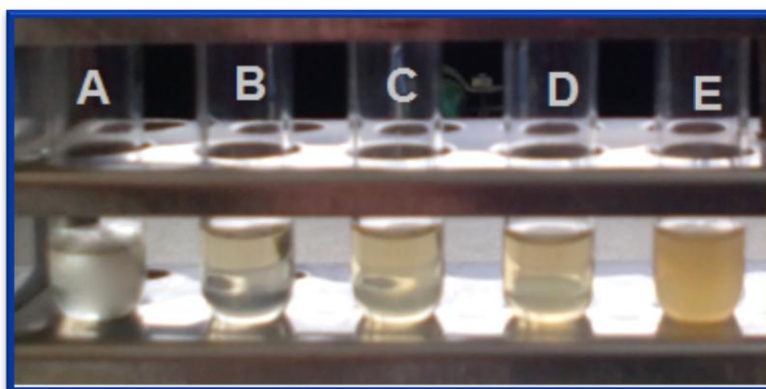


Fig. 18 Prueba de Concentración Inhibitoria Mínima cepa 4, A (0.25mg/mL), B (0.5mg/mL), C (1mg/mL), D (1.5mg/mL), E (3mg/mL), se puede observar que en comparación con los estándares de crecimiento positivo y negativo, el tubo A presentó crecimiento de la levadura (Paz K, 2016). Fotografía tomada en Laboratorio 6 de Bioprospección Microbiológica en la Unidad de Investigación Multidisciplinaria, FESC-C4, UNAM.

- Propóleo 2. Toluca

Tabla 8 Resultados de la prueba de CIM, donde + indica crecimiento y - no crecimiento a diferentes concentraciones 0.25, 0.5, 1, 1.5, 3 mg/mL del EEP. Tomando como referencia a los estándares de crecimiento positivo y negativo.

Cepa	0.25 mg/mL	0.5 mg/mL	1 mg/mL	1.5 mg/mL	3 mg/mL	Estándar (+)	Estándar (-)
1	+	+	+	-	-	+	-
2	-	-	-	-	-	+	-
3	+	+	-	-	-	+	-
4	+	+	-	-	-	+	-
5	+	-	-	-	-	+	-
6	+	-	-	-	-	+	-
7	+	-	-	-	-	+	-
8	+	+	-	-	-	+	-
ATCC 14522	+	+	-	-	-	+	-

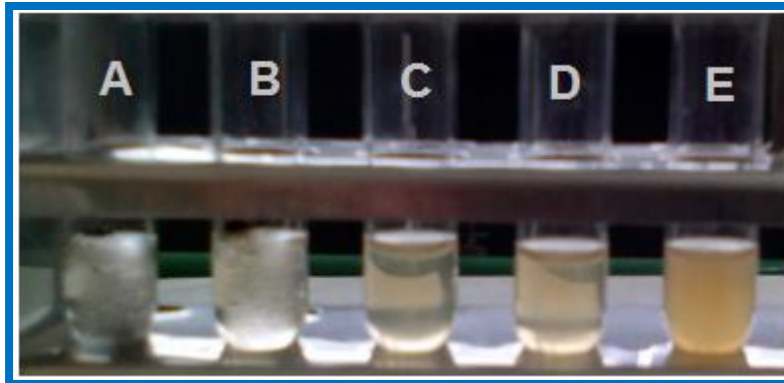
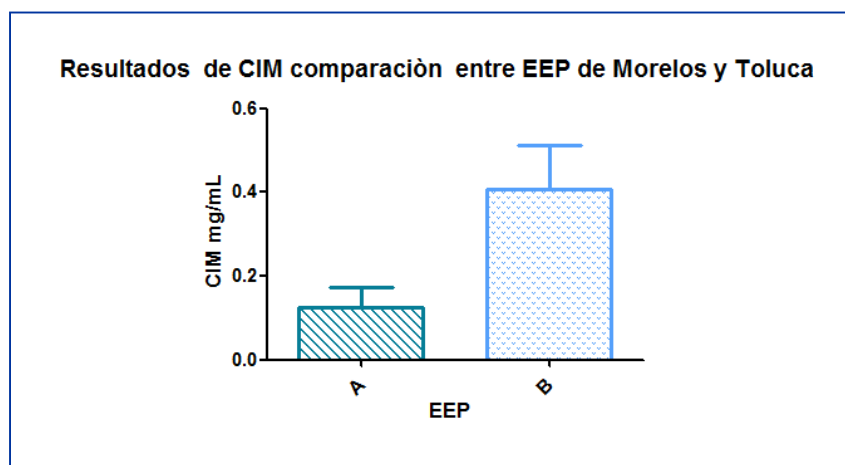


Fig. 19 Prueba de Concentración Inhibitoria Mínima cepa 7, A (0.25mg/mL), B (0.5mg/mL), C (1mg/mL), D (1.5mg/mL), E (3mg/mL), se puede observar que en comparación con los estándares de crecimiento positivo y negativo, el tubo A y B presentan crecimiento de la levadura al observarse turbios. (Paz K, 2016). Fotografía tomada en Laboratorio 6 de Bioprospección Microbiológica en la Unidad de Investigación Multidisciplinaria, FESC-C4, UNAM.

El propóleo de Morelos presentó una CIM promedio de 0.27 mg/mL, mientras que el propóleo de Toluca presentó una reducción de crecimiento a una concentración promedio de 0.44 mg/mL.

Posteriormente se realizó un análisis estadístico para determinar si había diferencia entre ambos propóleos, al realizar dicho análisis se encontró que si hay una diferencia significativa ($p < 0.0001$). (Gráfica 4)



Gráfica 4 Se observan los resultados comparativos de CIM de ambos propóleos siendo (A) el EEP Morelos y (B) Toluca. El EEP de Morelos presenta una CIM menor que el EEP de Toluca, y tras realizar el análisis estadístico se obtiene que la diferencia si es significativa ($p < 0.0001$)

Prueba de la Concentración Fungicida Mínima (CFM)

Para poder observar e identificar la concentración a la que el propóleo presenta actividad fungicida, se realiza la CFM y para ello se sembraron los tubos utilizados en la CIM (Fig.20), en la cual la presencia (mayor o igual a 3 colonias) o ausencia de las mismas en el agar representará la eliminación de la levadura, por efecto del propóleo.

- Propóleo 1. Morelos

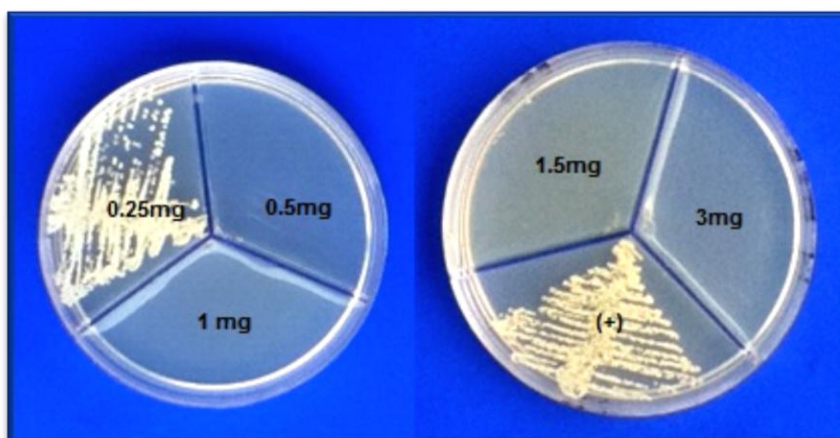


Fig. 20 Prueba de Concentración fungicida mínima cepa 4, esta cepa presentó crecimiento a la concentración de 0.25 mg/mL, y una inhibición a las concentraciones de 0.5, 1, 1.5 y 3 mg/mL. El estándar de crecimiento positivo también presenta levaduras (Foto Paz K, 2016). Fotografía tomada en Laboratorio 6 de Bioprospección Microbiológica en la Unidad de Investigación Multidisciplinaria, FESC-C4, UNAM.

Tabla 9 Registros de los resultados obtenidos en la CFM, según la presencia de crecimiento o inhibición de levadura a partir de los tubos de la CIM.

Cepa	0.25 mg/mL	0.5 mg/mL	1 mg/mL	1.5 mg/mL	3 mg/mL	Estándar (+)	Estándar (-)
1	+	-	-	-	-	+	-
2	+	-	-	-	-	+	-
3	+	+	-	-	-	+	-
4	+	-	-	-	-	+	-
5	+	-	-	-	-	+	-
6	+	+	-	-	-	+	-
7	+	-	-	-	-	+	-
8	+	-	-	-	-	+	-
ATCC 14522	+	+	-	-	-	+	-

- Propóleo 2. Toluca

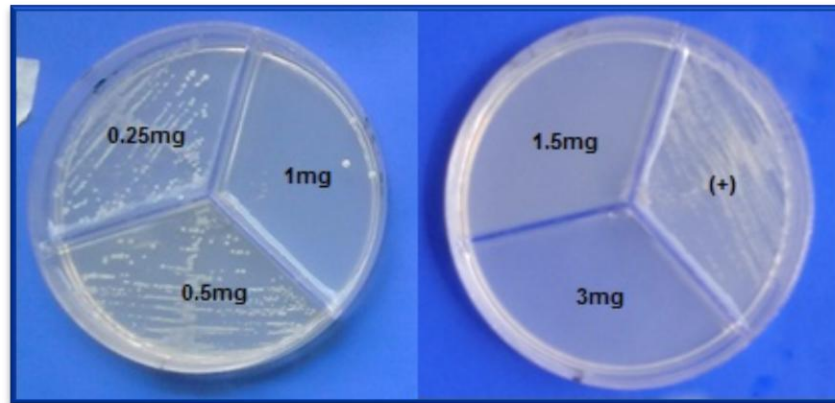


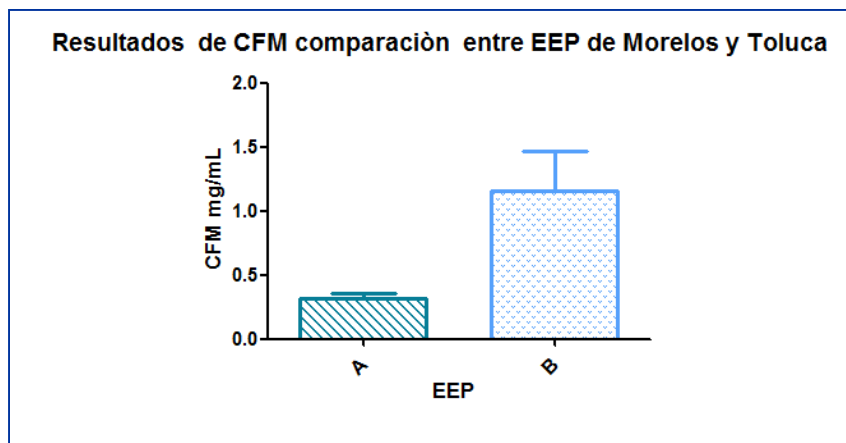
Fig. 21 Prueba de Concentración fungicida mínima cepa 4, esta cepa presentó crecimiento a la concentración de 0.25 y 0.5 mg/mL, y una inhibición a las concentraciones de 1, 1.5 y 3 mg/mL. El estándar de crecimiento positivo también presenta levaduras (Paz K, 2016). Fotografía tomada en Laboratorio 6 de Bioprospección Microbiológica en la Unidad de Investigación Multidisciplinaria, FESC-C4, UNAM.

Tabla 10 Tabla 6 Registros de los resultados obtenidos en la CFM, según la presencia de crecimiento o inhibición de levadura a partir de los tubos de la CIM.

Cepa	0.25 mg/mL	0.5 mg/mL	1 mg/mL	1.5 mg/mL	3 mg/mL	Estándar (+)	Estándar (-)
1	+	+	+	+	-	+	-
2	+	+	-	-	-	+	-
3	+	+	-	-	-	+	-
4	+	+	-	-	-	+	-
5	+	+	+	+	+	+	-
6	+	+/-	-	-	-	+	-
7	+	+	-	-	-	+	-
8	+	+	+	-	-	+	-
ATCC 14522	+	+	+	+	+	+	-

La lectura de CFM en promedio fue de 0.33 mg/mL para el propóleo de Morelos, y para el propóleo de Toluca se obtuvo un promedio de 1.22 mg/mL.

Se realizó un análisis estadístico para buscar si existía diferencia estadística, y se encontró que los valores de CFM entre los dos propóleos si presenta diferencia significativa ($p < 0.0001$) (Gráfica 5).



Gráfica 5 Se observan los resultados comparativos de CFM de ambos propóleos siendo (A) el EEP Morelos y (B) Toluca. El EEP de Morelos presenta una CFM menor que el EEP de Toluca, y tras realizar el análisis estadístico se obtiene que la diferencia si es significativa ($p < 0.0001$).

10. Discusión de resultados

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la actividad antimicótica de dos propóleos mexicanos contra cepas clínicas de *Malassezia pachydermatis* y una cepa de referencia ATCC 14522.

Se realizó la determinación de fenoles y flavonoides debido a que, aunque la composición del propóleo es muy compleja y existe una gran variedad de componentes con propiedades farmacológicas, las propiedades antimicóticas del propóleo han sido atribuidas principalmente a los fenoles y a los flavonoides, como la pinocembrina, galangina, pinobanskina y al CAPE (Manrique et al., 2008), además de que la gran importancia de estos compuestos orgánicos radica en su actividad antioxidante, que resulta de una combinación de sus propiedades quelatantes de hierro y secuestradoras de radicales libres y la inhibición de las oxidasas lipooxigenasa, ciclooxigenasa, mieloperoxidasa y la xantina oxidasa, evitando así la formación de especies reactivas de oxígeno y de hidroxiperóxidos orgánicos (Escamilla et al., 2009).

Para el caso del propóleo de Morelos se obtuvo un porcentaje del 27.64% de fenoles y para el propóleo de Toluca un valor de 23.26%, el contenido de estos compuestos fenólicos supera el valor mínimo de 5%, establecido por la norma oficial mexicana NOM-003-SAG/GAN-2017 (Propóleos, producción y especificaciones para su procesamiento). En la determinación de flavonoides se obtuvo un valor de 3.56% para el propóleo de Morelos y un valor de 3.47% para el propóleo de Toluca ambos valores superan el valor de 0.5% establecido por la norma oficial mexicana NOM-003-SAG/GAN-2017 (Federación, 2017).

En comparación con otros propóleos reportados en la bibliografía, el propóleo de Cuautitlán Izcalli que es considerado un propóleo con alto rendimiento, ya que se reportan valores de fenoles de 19.2+/- 2.9% y flavonoides de 4.04+/- 9.7%. Ambos propóleos del presente estudio Morelos y Toluca son buena opción, ya que presentan valores similares, y para el caso de propóleo procedente de Villa del Carbón con fenoles de 6.9+/- 0.0008% y flavonoides de 0.67+/-1.8% (Rodríguez, 2015), los propóleos de Toluca y Morelos representan una mejor opción.

Por otro lado, el color obtenido en la determinación cualitativa de fenoles mostró que ambos propóleos presentaron una tonalidad café marrón, uno más oscuro (EEP Morelos) que el otro (EEP Toluca), esto se debe a que en el procedimiento se lleva a cabo una reacción colorimétrica de óxido-reducción. En la prueba cualitativa de flavonoides, se pudo observar para ambos propóleos una tonalidad amarillo-naranja, esto es debido a que para el aislamiento de estos compuestos se

realizó una extracción con hidróxido de sodio y precipitaciones con acetato de plomo para separar a los polihidroxifenoles, el color desarrollado se presenta como un color amarillo intenso (Rodríguez, 2015). En las determinaciones cualitativas de fenoles y flavonoides se observa que, aunque ambos propóleos tienen un alto contenido de cada compuesto, el propóleo de Morelos representa una mejor opción con relación al propóleo de Toluca, ya que se pueden observar tonalidades más intensas tanto para fenoles y flavonoides.

En la prueba de inhibición de crecimiento radial, se pudo observar que ambos propóleos presentaron halos de inhibición en las cuatro concentraciones (2, 4, 8, 16mg/mL), y la variación entre uno y otro se observó en la medida de dichos halos, encontrándose que el propóleo de Morelos tiene mayor efecto inhibitorio sobre *M. pachydermatis* que el propóleo de Toluca, y tras realizar un análisis estadístico se obtuvo que si existe una diferencia significativa ($p < 0.0001$). El efecto del propóleo se comprobó con la elaboración de controles negativos con los diluyentes (DMSO y EtOH), ya que no presentaron ninguna inhibición para la levadura.

Las pruebas de sensibilidad cuantitativa mostraron resultados similares que otros autores ya reportan contra *M. pachydermatis*. Se obtuvo una CIM promedio de 0.27mg/mL con el propóleo de Morelos y 0.44mg/mL en promedio con el propóleo de Toluca. Reportes en la bibliografía muestran CIM similares utilizando otros propóleos, tal es el caso de Cardoso que reporta un valor de 0.26 mg/mL para un propóleo brasileño y Tovar reporta un valor de 0.25 mg/mL para un propóleo proveniente del Estado de México (FESC). La Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) está definida como la concentración más baja que produce una inhibición del crecimiento de un 100% (Cantón et al., 2007) por lo tanto, el propóleo de Morelos representa una mejor opción para inhibir el crecimiento de *M. pachydermatis*.

En la determinación de la CFM se obtuvo un valor promedio de 0.33mg/mL para el propóleo de Morelos y una CFM promedio de 1.22 mg/mL para el EEP de Toluca, y una vez realizado el análisis estadístico se fue posible detectar una diferencia significativa ($p < 0.0001$). La CFM se define como la concentración mínima en la que se observa la disminución del 99.9% del crecimiento de un hongo (Graybill, 2004) ; así en la prueba se observó que el propóleo de Morelos presentó un mayor efecto sobre la levadura, en comparación del propóleo de Toluca; aun así, en ambos propóleos se puede observar un efecto fungicida.

El efecto fungicida que presentaron ambos propóleos puede atribuirse al daño celular causado por sus componentes. En el 2016, Tovar B. describe los efectos del propóleo sobre *Malassezia pachydermatis* a nivel celular (alteración en la forma y tamaño normal de la levadura, cambios estructurales, cambios en la superficie de la levadura, presencia de poros y, en algunos casos, ruptura total de la superficie celular). Aunque en ese estudio se utilizó un propóleo proveniente del Estado de México (FESC), este se puede utilizar como referencia para describir el efecto fungicida de los propóleos de Morelos y Toluca.

11. Conclusiones

1. Los propóleos mexicanos (Morelos y Toluca) tienen un efecto *in vitro* sobre *Malassezia pachydermatis*.
2. La determinación de fenoles y flavonoides demostró que el efecto del propóleo de Morelos es mayor que el efecto de Toluca.
3. Los halos de inhibición producidos por ambos propóleos son diferentes, presentando halos más grandes el propóleo de Morelos en las cuatro concentraciones utilizadas.
4. Los resultados obtenidos en las pruebas de sensibilidad cuantitativa (CIM y CFM) son similares en ambos propóleos, pero estadísticamente existen diferencias significativas entre un propóleo y otro, lo que significa que cada propóleo presenta propiedades diferentes fungicidas sobre la levadura.
5. Los resultados obtenidos permiten establecer la base para la formulación de un tratamiento tópico con propóleo de Morelos o de Toluca como una alternativa en el tratamiento de la otitis canina producida por *Malassezia pachydermatis*.

12. Referencias

- Affinity, V. (20, enero, 2015). *Dermatitis Por Malassezia*. Barcelona: Affinity y petcare, S.A. Recuperado de <https://www.affinity-petcare.com/veterinary/patologias/dermatitis-por-malassezia>
- Bankova, V., De Castro, S., Marcucci, M. (27, enero, 2000). *Propolis: recent advances in chemistry and plant origin*. *Apidologie*, vol 31 (n° 1), p. 3-15. doi:10,1051.
- Betancourt, N. (2016). *Estudio de la actividad antimicótica in vitro del propóleo mexicano contra Malassezia pachydermatis*. Estado de México: Universidad Nacional Autónoma de México.
- Cantón, E., Mazuelos, E., Espinel, A. (13, septiembre, 2007). *Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A)*. *Revista iberoamericana de micología*, vol 8 (n° 1), p. 15a 1- 15b 6.
- Cardoso, R. L., Maboni, F., Machado, G., Alves, S. H., De Vargas, A.C. (19, mayo, 2010). *Antimicrobial activity of propolis extract against Staphylococcus coagulase positive and Malassezia pachydermatis of canine otitis*. *Veterinary Microbiology*, vol 142 (n°3-4), p.432–434. doi:10.1016
- Chen, T.a., Hill, P.B. (21, febrero, 2005). *The biology of Malassezia organisms an their ability to induce immune responses and skin disease*. *Veterinary Dermatology*, vol 16 (n°1), p.4-26. doi: 10.1111
- Cole, L.K., Kwochka, K.W., Kowalski, J.J., Hillier, A. (15, febrero, 1998). *Microbial Flora and antimicrobial susceptibility patterns of isolated pathogens from the horizontal ear canal and middle ear in dogs with otitis media*. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, vol 212 (n°4), p. 534-538.
- Córdova, E., Bazán, E., Hernández, F. (09, octubre, 2015). *Enfermedades causadas por el género Malassezia*. Ciudad de México: Facultad de Medicina UNAM. Recuperado de <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/micologia/pitiriasis.html>
- Done, S. H., Stickland, N.C., Evans, S. A., Goody, P. C. (2ª edición). (2010) *Atlas en color de anatomía veterinaria "El perro y el gato"*. Barcelona, España : Elsevier.

- Escamilla, C. I., Cuevas, E. Y., Guevara, J. (2009). *Flavonoides y sus acciones antioxidantes*. Medigraphic Artemisa, vol 52 (n°2), p.73 - 75.
- Farré, R., Frasquet, I., Sánchez, A. (2004). *Propolis and human health*. Ars Pharmaceutica, vol 45 (n°1), p. 21-43.
- Federación, D. (06, octubre, 2017). *Norma Oficial Mexicana NOM-003-SAG/GAN-2017, Propóleos, producción y especificaciones para su procesamiento*. Recuperado de http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5500103&fecha=06/10/2017
- Freitas, f., Tranches, A.L., Lacerda, C., Ikegaki, M., de Siqueira, A., Franco, M.C. (04, abril, 2007). *Evaluation of the antifungal activity "in vitro" of the extract of propolis G12 in Cryptococcus neoformans*. Instituto de medicina tropical de Sao Paulo, vol 49 (n°2), p. 93- 95.
- Goth, G. (2011). *Dermatología canina y felina*. Villatuerta Navarra España: Servet .
- Graybill, J. (04, agosto, 2004). *Mechanisms of action and impact in the clinical practice of antifungal drug resistance*. Medwave biomedical journal, vol 4 (n°7), p. 3613- 3625. doi: 10.5867.
- Ikigai, H., Nakae, T., Hara, Y., Shimamura, T. (8, abril, 1993). *Bactericidal catechins damage the lipid bilayer*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA), vol 1147 (n°1), p. 132- 136. doi: 10.1016.
- Kujumgiev, A., Tsvetkova, I., Serkedjieva, Y., Bankova, V., Popov, S. (03, marzo, 1999). *Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin*. Journal of Ethnopharmacology, vol 64 (n°3), p. 235–240. doi:10.1016.
- Kuropatnicki, A., Szliszka, E., Krol, W. (29, marzo, 2013). *Historical Aspects of Propolis Research in Modern Times*. Hindawi, vol 2013 (n°2013), p. 1-11. doi: 10.1155.
- Lacalle, A. (2008). *Propoleo, el "antibiótico" natural de la colmena*. Revista Agropesquera, vol 213 (n°85), p. 56-61.
- Ledón, N., Casacó, A., González, R., Merino, N., González, A., Tolón, Z. (07, abril, 1996). *Efectos antipsoriásico, antiinflamatorio y analgésico del propoleo rojo colectado en Cuba*. Revista Cubana de Farmacia, vol 30 (n°1), p. 15-29.

- Lodoño, A., Penierres, J., García, G., Carrillo, L., Quintero, L., García, S., Mendoza, M., Cruz, T. (2008). *Estudio de la actividad antifúngica de un extracto de propóleo de la abeja Apis mellifera proveniente del estado de México. Tecnología en Marcha*, vol 21 (n°1), p.49-55.
- Lorenzana, C. (2016). *Otitis externa: Etiopatogenia, diagnóstico y tratamiento*. México: Virbac al día. Recuperado de <http://www.webveterinaria.com/virbac/news16/comp.pdf>.
- Lozina, L., Boehringer, S., Koscinczuk, P., Acosta, O. (2006). *Resultados preliminares para determinar la eficacia terapéutica de gotas óticas con propóleos en el tratamiento de otitis externas en caninos*. Comunicaciones científicas y Tecnológicas, vol 047.
- Lozina, L., Boehringer, S., D' Aquino, M., Acosta, O. (2006). *Eficacia del Propóleo sobre Malassezia pachydermatis. Correlación de distintas Técnicas in Vitro*. Acta Farmacéutica Bonaerense, vol 25 (n°4), p. 560-563
- Lozina, L., Peichoto, M., Acosta, O., Granero, G. (2010). *Estandarización y Caracterización Organoléptica y Físico-Química de 15 Propóleos Argentinos*. Revista Latinoamericana de Farmacia, vol 29 (n°1), p.102-110.
- Manrique, A. J. (2011). *Actividad antimicrobiana de propóleos provenientes de dos zonas climáticas del estado Miranda, Venezuela. Efecto de la variación estacional*. Zootecnia Tropical, vol 24 (n°1), p. 28-37.
- Manrique, A., Santana, W. (27, mayo, 2008). *Flavonoides, actividades antibacteriana y antioxidante de propóleos de abejas sin aguijón, Melipona quadrifasciata, Melipona compressipes, Tetragonisca angustula y Nannotrigona sp. de Brasil y Venezuela*. Zootecnia tropical, vol 26 (n°2), p. 157-166.
- Martín, J., Tejedor, M., Lupiola, P., Morales, M., González, Z. (2001). *Relación entre la presencia de Malassezia pachydermatis y los signos clínicos encontrados en cuadros de otitis crónicas caninas en una población de perros de raza Podenco canario*. Clínica veterinaria pequeños animales, vol 21 (n°2), p. 103- 111.
- Martínez J., García C., Durango D., Gil J. (05, abril, 2012). *Characterization of propolis from municipality of Caldas obtained through two collection methods*. Revista MVZ Córdoba, vol 17 (n°1), p. 2861-2869.
- Mirzoeva, A., Grishanin, R., Calder, P. (septiembre, 1997). *Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth,*

membrane potential and motility of bacteria. Microbiological Research, vol 152 (n°3), p. 239-246.

- Mirzoeva, O., Calder, P. (1996). *The effect of propolis and its components on eicosanoid production during the inflammatory response*. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids, vol 55 (n°6), p. 441–449.
- Mori, A., Chikao, N., Nobuyaso, E., Shinkichi, T. (1987). *Antibacterial activity and mode of action of plant flavonoids against Proteus vulgaris and Staphylococcus aureus*. Phytochemistry, vol 26 (n°8), p. 2231-2234. doi:10.1016
- Ntondo, B., Kikuni, T., Schilcher, H. (1994). *Electron Microscopic and Microcalorimetric Investigations of the Possible Mechanism of the Antibacterial Action of a Defined Propolis Provenance*. Planta médica, vol 60 (n°3), p.222-227. doi: 10.1055
- Ôzcan, M. (1999). *Antifungal properties of propolis* . Grasas y Aceites International Journal of Fats and Oils, vol 50 (n°5), p.395-398 .
- Pineda, J., Principal, J., Barrios, C., Milla, D., Solano, Y., Gil, E. (2013). *In vitro fungistatic property of propolis on three Colletotrichum gloeosporioides isolates*. Zootecnia tropical, vol 28 (n°1), p. 30-45.
- Pontin, K., A. Da Silva, A., Francisco, F., Andrade, M., Cunha, W., Nanayakkara, D., Bastos, J., de Albuquerque, S. (2008). *In vitro and in vivo antileishmanial activities of a Brazilian green propolis extract*. Parasitology Research, vol 103 (n°3), p.487–492. doi: 10.1007.
- Quinn, P., Markey, B., Leonard, F., FitzPatrick, E., Fanning, S., Hartigan, P. (2a Ed). (2011). *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. Oxford: Wiley- Blackwell.
- Quintero, M. L., Lodoño, A., Hernandez, F., Manzano, P., Lopez, R., Soto, C., Carrillo, L., Penieres, G., Garcia, G., Cruz, T. (2008). *Efecto de extractos de propóleos*. Revista Iberoamericana de Micología, vol 25, p. 22-26.
- Rodriguez, B. (2015). *Perfil químico de propóleos mexicanos para su aplicación en medicina veterinaria (Tesis de maestría)*. UNAM-FESC: Estado de México.
- Sálmon, V. (2014). *Propolis another therapeutic resource in the clinical training*. Universidad de cantabria: Departamento de enfermería E.U.E. Recuperado

de<https://repositorio.unican.es/xmlui/bitstream/handle/10902/5580/NoriegaSalmonV.pdf?sequence=1>.

- Salomao, K., Dantas, A., Borba, C., Campos, L., Machado, D., Aquino Neto, F., de Castro, S. (2004). *Chemical composition and microbicidal activity of extracts from Brazilian and Bulgarian propolis*. Letters in Applied Microbiology, vol 38 (nº2), p. 87–92.
- Sánchez, R., Calle, S., Fálcon, N., Pinto, C. (2011). *Aislamiento bacteriano en casos de otitis canina y su susceptibilidad antibiótica*. Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú, vol 22 (nº2), p. 161-166.
- Shuai, H., Zhang, CP., Wang, K., Li, GQ., Hu, FL. (26, noviembre, 2014). *Recent advances in the chemical composition of propolis*. Molecules, vol 19 (º12), p. 19.610-19.632. doi: 10.3390.
- Simuth, J., Trnovsky, J., Jelokova, J. (1986). *Inhibition of bacterial DNA-dependent RNA polymerases and restriction endonuclease by UV-absorbing components from propolis*. Die Pharmazie, vol 41(nº2), p.131-132.
- De Castro, S. (2001). *Propolis: Biological an pharmacological activities. Therapeutic uses of this bee product*. Labatory of cell biology, vol 3 (nº1), p. 48-84.
- Soto, C., Gonzalez, M., Juarez, M., Ramirez, H., Cruz, T., Carrillo, L., Penieres, G. (2008). Efecto porotector de un propóleo mexicano en celulas MDBK expuestas a la infección del virus de pseudorabia.
- Strehl, E., Volpert, R., & F. Elstner, E. (02, junio, 2014). *Biochemical Activities of Propolis-Extracts III. Inhibition of Dihydrofolate Reductase*. Zeitschrift für Naturforschung C A Journal of Biosciences, vol 49 (nº1-2), p. 39–43. doi: 10.1515.
- Tinoco, V., Quesada, J., Maldonado, M., Oliver,R., Luna, B. (2013). *Leukocyte death incited by propolis toxicity*. Revista odontológica mexicana, vol 17 (nº3), p. 159-163.
- Tovar, N., García, L., Cruz, T. (15, enero, 2015). *Propolis in Dogs: Clinical Experiences and Perspectives (A Brief Review)*. Open Journal de Medicina Veterinaria, vol 5 (nº1), p.11-17.
- Rao, C., Desai, D., Kaul, B., Aminb, S., Reddy, B. (16, noviembre, 1992). *Effect of caffeic acid esters on carcinogen-induced mutagenicity and human*

colon adenocarcinoma cell growth. *Chemico-Biological Interactions*, vol 84 (n°3), p. 277–290.

- Vargas, R., Torrescano, G., Mendoza, A., Vallejo, G., Acedo, E., Sanchez, J., Peñalba, M., Sánchez, A.(2014). *Mecanismos involucrados en la actividad antioxidante y antibacteriana del propóleo*. *Biotecnia*, vol 16 (n°1), p. 32-37 .
- Velazquez, C., Navarro, M., Acosta, A., Angulo, A., Dominguez, Z., Robles, R., Robles, R., Lugo, E., Goycoolea FM., Velazquez EF., AstiazaranH., Hernandez, J.(19, junio, 2007). *Antibacterial and free-radical scavenging activities of Sonoran propolis*. *Journal Applied Microbiology*, vol 103 (n°5), p. 1747-1756. doi: 10.1111.
- Wei, H., Frenkel, K. (01, junio, 1993). *Relationship of oxidative events and DNA oxidation in SENCAR mice to in vivo promoting activity of phorbol ester-type tumor promoters*. *Carcinogenesis*, vol 14 (n°6), p.1195-1201.doi: 10.1093.