



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

Evaluación *in vitro* de productos comerciales de propóleo contra  
especies de *Aspergillus*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

QUE PRESENTA:

ALMA ROSA ORTIZ ARREDONDO

ASESOR:

M. en C. BETSABÉ RODRÍGUEZ PÉREZ

COASESOR:

Dr. TONATIUH A. CRUZ SÁNCHEZ

CUAUTITLAN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2019.



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
SECRETARÍA GENERAL  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLÁN

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA  
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales  
de la FES Cuautitlán.

DEPARTAMENTO DE

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

**Evaluación *in vitro* de productos comerciales de propóleo contra especies de *Aspergillus*.**

Que presenta la pasante: **Alma Rosa Ortiz Arredondo**

Con número de cuenta: **309171513** para obtener el Título de la carrera: **Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica**

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

**ATENTAMENTE**

**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 25 de Febrero de 2019.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	Dr. Enrique Salas Téllez	
<b>VOCAL</b>	QFB. Brígida del Carmen Camacho Enriquez	
<b>SECRETARIO</b>	M. en C. Betsabé Rodríguez Pérez	
<b>1er. SUPLENTE</b>	Dra. Alma Lucila Nuñez del Arco	
<b>2do. SUPLENTE</b>	QFB. Verónica Ruiz Solorio	

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

# Agradecimientos

A mi asesora por todo el apoyo brindado, no solo en la realización de este trabajo si no por el conocimiento que ha dejado huella en mi vida. Al Dr. Tonatiuh por abrirme las puertas del laboratorio y dejarme ser una pequeña parte de un proyecto tan especial.

A mi familia por el apoyo incondicional, mis papas que no me han dejado caer y que si tengo fallas en algo están ahí para lo que necesite. Gracias por todo el sacrificio, sinceramente lo aprecio de todo corazón. Gracias por llevarme de la mano a todos mis logros. A mis hermanas que son el mejor ejemplo a seguir. Gracias por cada consejo, cada momento que me escuchan, por cada enseñanza y por dejarme hacer tantas locuras.

Agradezco a Dios porque soy muy afortunada al tener 5 ejemplos de vida que me enseñan a ser una persona responsable, dedicada y honesta, son lo mejor que tengo.

A mis amigos que me han apoyado tanto, porque no me dejan quedarme atrás, gracias a ellos este camino ha sido lo más divertido. A Lucila, Endora, Monse, Ugo, Karla, Sergio, Diana y Clara por animarme y apoyarme a lo largo de este proyecto.

En especial agradezco a mis amigos del bosque porque a pesar de que el juntarnos fuera una coincidencia, aprecio cada momento que hemos compartido, chico para y chico de intercambio gracias por ser parte de mi vida.

A mi segunda casa a la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por la oportunidad de realizar mis estudios profesionales, es un orgullo pertenecer a esta institución.

**GRACIAS TOTALES.**

*Nada en este mundo debe ser temido... solo entendido.*

*Ahora es el momento de comprender más, para que podamos temer menos.*

*Marie Curie.*

LUGAR DE REALIZACIÓN:  
UNAM FESC CAMPO 4, UIM, LABORATORIO DE BIOPROSPECCIÓN MICROBIOLÓGICA



Este trabajo fue presentado en:

- En el I Congreso de Disciplinas Microbiológicas con el trabajo: “Evaluación *in vitro* de extractos comerciales de Propóleo contra especies de *Aspergillus*”, en Marzo de 2018.
- En el IX Congreso Nacional de Micología Médica con el trabajo: “Evaluación *in vitro* de extractos de propóleo comerciales contra especies de *Aspergillus*”, en Octubre de 2017.
- En el III Congreso de Ciencia, Educación y Tecnología con el trabajo: “Evaluación de la actividad antifúngica de propóleos comerciales en *Aspergillus flavus*”, en Junio de 2017.



Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán



Otorgan la presente

# Constancia

**Alma Rosa Ortiz Arredondo, Betsabé Rodríguez Pérez,  
Tonatiuh A, Cruz Sánchez**


Por su participación con trabajo en cartel

Evaluación *in vitro* De extractos de propóleo comerciales contra especies de *Aspergillus*

En el  
**1er Congreso de  
Disciplinas  
Microbiológicas**

realizado el 22 y 23 de marzo de 2018  
en la Unidad de Seminarios Dr. Jaime Keller Torres, Campo Cuatro.

*"Por mi raza hablará el espíritu"*  
Cuautitlán Izcalli, Estado de México, marzo de 2018.

  
Dra. Alma Lucía Nuñez del Arco  
Organizadora del Congreso

  
Dr. Enrique Salas Téllez  
Organizador del Congreso

  
Dra. Eva Guadalupe Lizárraga Paulín  
Organizadora del Congreso





LA ASOCIACIÓN MEXICANA DE MICOLOGÍA MÉDICA A.C.

9 CONGRESO NACIONAL DE MICOLOGÍA MÉDICA

OTORGA LA PRESENTE:

# CONSTANCIA

A



M. en C. Rodríguez-Pérez Betsabé, pB.Q.D Ortiz-Arredondo Alma Rosa

POR SU PARTICIPACIÓN EN:

**CARTELES**

**“EVALUACIÓN *in vitro* DE EXTRACTOS DE PROPÓLEO COMERCIALES CONTRA ESPECIES DE *Aspergillus*”**

EN EL IX CONGRESO NACIONAL DE MICOLOGÍA MÉDICA  
“DR. AMADO GONZÁLEZ MENDOZA Y DR. JESÚS MAYORGA LOERA”

Guadalajara, Jalisco, 19 al 21 de Octubre de 2017

Dra. Francisca Hernández Hernández  
Vice-Presidente

M. en C. Jorge A. Mayorga Rodríguez  
Presidente (2015-17)

Dr. Víctor Manuel Tarango Martínez  
Secretario





UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO  
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

Otorgan el presente

3er CONGRESO



3er CONGRESO DE  
CIENCIA, EDUCACIÓN Y  
TECNOLOGÍA

## 3er CONGRESO DE CIENCIA, EDUCACIÓN Y TECNOLOGÍA



# RECONOCIMIENTO

A:A. Ortiz, B. Rodriguez, T. Cruz

Por su valiosa participación y asistencia en la exposición de cartel:

**“Evaluación de la actividad antifúngica de propóleos comerciales en *Aspergillus Flavus*”**

que se llevó a cabo  
del 19 al 22 de junio de 2017  
en las instalaciones de esta Facultad

**“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”**  
Cuautitlán Izcalli, Estado de México, junio de 2017

**Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez**  
Jefa de la División de Ciencias Químico Biológicas

## Índice

INDICE DE FIGURAS .....	VIII
INDICE DE TABLAS .....	IX
ABREVIATURAS.....	I
Resumen.....	2
1. Antecedentes .....	3
1.1.1 Productos de colmena.....	4
1.2 El Propóleo .....	4
1.2.1 Composición.....	5
1.2.2 Comercialización del Propóleo.....	7
1.2.3 Aspectos regulatorios.....	8
1.2.4Propiedades del propóleo .....	9
1.3 <i>Metabolitos secundarios</i> .....	10
1.3.1 <i>Fenoles</i> .....	11
1.3. 2 <i>Flavonoides</i> .....	12
2 Hongos filamentosos.....	13
2.1 Generalidades del genero <i>Aspergillus</i> .....	13
2.2 Morfología de las especies de <i>Aspergillus</i> . .....	14
2.3 Importancia de <i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. fumigatus</i> y <i>A. niger</i> . .....	15
2.4 Manifestaciones clínicas .....	16
2.5 Diagnóstico.....	17
2.6 Tratamiento.....	18
3. <i>Antifúngicos</i> .....	19
3.2 Mecanismo de acción de los antifúngicos .....	20
3.3 Relación estructura-actividad de los antifúngicos. ....	22
4 <i>Justificación</i> .....	24
5 <i>Hipótesis</i> .....	24
6 <i>Objetivo General</i> .....	24
6.1 Objetivos Particulares .....	24
7 <i>Metodología</i> .....	25
7.1 Materiales y métodos .....	26
7.2 Obtención del Extracto de los Productos Comerciales .....	26

7.3 Pruebas Sensoriales.....	27
7.4 Perfil Químico.....	27
7.4.1 Presencia de fenoles.....	27
7.4.2 Presencia de flavonoides.....	27
7.4.3 Índice de oxidación.....	27
7.5 Determinación de compuestos fenólicos (Método de Folin-Ciocalteu).....	28
7.6 Cuantificación de flavonoides.....	28
7.7 Pruebas microbiológicas.....	28
7.7.1 Microorganismos.....	28
7.7.2 Preparación de los hongos filamentosos.....	29
7.7.3 Identificación macroscópica.....	29
7.7.4 Identificación microscópica.....	29
7.7.5 Prueba de inhibición del crecimiento radial.....	29
8 Resultados y discusión.....	30
9 Conclusiones.....	47
10 Prospectivas.....	47
12. Referencias.....	49
13. Anexos.....	53
ANEXO 1 DESTILACIÓN A PRESIÓN REDUCIDA.....	53
ANEXO 2. DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES.....	54
ANEXO 3. LA DETERMINACIÓN DE FLAVONOIDES.....	55

## INDICE DE FIGURAS

Figura		Pág.
1	Abeja recolectando polen.	2
2	Abeja recolectando resinas.	3
3	Principales componentes químicos del propóleo.	5
4	Producción de polen y propóleo en México.	7
5	Estructura de los componentes fenólicos.	10
6	Estructura básica y tipos de flavonoides.	12
7	Estructuras morfológicas de la especie <i>Aspergillus</i> .	13
8	Características morfológicas de <i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. fumigatus</i> y <i>A. niger</i> .	14
9	Síntomas de Aspergilosis.	16
10	Hallazgos Topográficos de Aspergilosis.	17
11	Síntesis de la membrana del hongo y la señalización de los blancos de los agentes antimicóticos.	21
12	Prueba cualitativa de presencia de fenoles en productos comerciales de propóleo	31
13	Prueba cualitativa de presencia de flavonoides en productos comerciales de propóleo.	31
14	Identificación de <i>Aspergillus flavus</i> .	37
15	Identificación de <i>Aspergillus fumigatus</i> .	38
16	Identificación de <i>Aspergillus niger</i> .	39
17	Inhibición de crecimiento radial en <i>A. flavus</i> , <i>A. fumigatus</i> y <i>A. niger</i> utilizando discos comerciales.	40
18	Inhibición de crecimiento radial de <i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. fumigatus</i> y <i>A. niger</i> utilizando discos impregnados con PCP y EPCP número 11.	43

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla</b>		<b>Página</b>
1	Clasificación de los antifúngicos por su estructura.	19
2	Identificación de los extractos de propóleos comerciales.	24
3	Apariencia y características organolépticas de los Productos Comerciales de Propóleo Blanco (EPCP).	29
4	Resultados de la determinación del índice de oxidación.	32
5	Resultados de las determinaciones de fenoles y flavonoides de los productos comerciales (PCP) y el extracto de los productos comerciales de propóleo (EPC).	34
6	Resultados de la inhibición de crecimiento de las especies utilizadas utilizando discos comerciales.	41
7	Resultados de la lectura de la prueba de inhibición de crecimiento radial utilizando PCP y EPCP, sobre las diferentes especies de <i>Aspergillus</i> .	42

## ABREVIATURAS

<b>°C</b>	Grados Celsius
<b>a.c.</b>	antes de Cristo
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>CAPE</b>	Fenitil Éster del Ácido Cafeico
<b>COFEMER</b>	Comisión Federal de Mejora Regulatoria
<b>DAMP's</b>	Damage-associated molecular patterns (Patrones Moleculares Asociados al Daño)
<b>EPCP</b>	Extracto de Producto comercial de Propóleo
<b>ELISA</b>	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas)
<b>EMA</b>	European Medicines Agency (Agencia Europea de Medicamentos)
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration (Administración de Alimentos y Medicamentos)
<b>IgE</b>	Inmunoglobulina E
<b>INEGI</b>	Instituto Nacional De Geografía E Informática
<b>INTA</b>	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (Argentina)
<b>IRAM</b>	Instituto Argentino De Normalización
<b>kb</b>	Kilobase que equivale a 1000 pares de base
<b>NOM</b>	Norma Oficial Mexicana
<b>PAMP's</b>	Pathogen-Associated Molecular Patterns (Patrón Molecular Asociado A Patógenos)
<b>PCP</b>	Producto Comercial de Propóleo
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa)
<b>PRR's</b>	Pattern Recognition Receptor (Receptor de Reconocimiento de Patrones)
<b>QSAR</b>	Quantitative Structure-Activity Relationship (Relación cuantitativa actividad-estructura)
<b>SAGARPA</b>	Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural y Pesca*
<b>SADER</b>	Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (antes SAGARPA)
<b>UV-Vis</b>	Ultravioleta-Visible
<b>VIH</b>	Virus de Inmunodeficiencia Humana

## Resumen

En los últimos años en México, la medicina tradicional ha tenido una gran demanda. Es por lo que se han buscado alternativas terapéuticas en los recursos naturales, tal es el caso de los productos de colmena que son usados con fines terapéuticos. (Ruiz, 2015)

El propóleo es una sustancia compleja debido a sus componentes, este producto procesado por las abejas tiene propiedades medicinales debidas a compuestos polifenólicos, las cuales han sido aprovechadas para la elaboración de productos comerciales a base de este producto apícola.

Con el fin de comprobar si estos productos son eficaces, en este trabajo se evaluó la acción antifúngica de extractos de propóleos comerciales sobre el crecimiento de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus* y *Aspergillus niger*.

Utilizando once muestras de productos comerciales de propóleo se obtuvieron los extractos secos por medio de una destilación a presión reducida. Se realizó un perfil químico y la prueba de inhibición de crecimiento radial con discos impregnados a concentración de 16 mg/disco.

Se comprobó que todos los productos comerciales utilizados contenían compuestos bioactivos, sin embargo, de las once muestras solo seis tuvieron una actividad antifúngica contra las especies de *Aspergillus* utilizadas, teniendo una mayor respuesta con los extractos de propóleo comerciales que los productos comerciales de propóleo (tinturas), también se observó que la cantidad de fenoles y flavonoides no es proporcional al efecto de inhibición de los hongos filamentosos

Es importante que estos productos comerciales apícolas se evalúen para que de esta forma garanticen la calidad y la eficacia de estos productos.

**Palabras clave:** Propóleo, productos comerciales, *Aspergillus*, fenoles y flavonoides.

## 1. Antecedentes

En la prehistoria la medicina empleaba productos naturales como las plantas medicinales, minerales o partes de animales, con el tiempo esto fue avanzando en conocimientos y tecnología, haciéndola más confiable.

Los productos naturales se emplearon con el objetivo de mejorar los males que aquejaron al hombre que le han acompañado en el transcurso de los siglos. Estos fueron utilizados por diversas civilizaciones como la: egipcia, griega, romana, china, hindú, persa, maya, olmeca, entre otras; con diversas finalidades, en la actualidad a esta recopilación de conocimientos se le llama medicina tradicional.

Según la definición de la OMS (2018), la medicina tradicional es la suma total de conocimientos, habilidades y prácticas basados en teorías, creencias y experiencias de las diferentes culturas, sean o no explicables, y usados en el mantenimiento de la salud, así como en la prevención, diagnóstico o tratamiento de las enfermedades físicas o mentales.

La referencia más antigua data en Egipto en 1700 a.C. en el papiro de Ebers, donde mencionan al propóleo como bálsamo que utilizaban para embalsamarlos cuerpos.

En México existen antecedentes de la actividad apícola con más de 3000 años, existen registros en la cultura Olmeca y en la Maya de esta última, hay más datos sobre los antecedentes y prácticas apícolas, las cuales se practican en la actualidad(INEGI,2009).



**Figura 1.** Abeja recolectando polen.

Foto: Alma R. Ortiz



### 1.1.1 Productos de colmena.

La apicultura es la actividad dedicada a la crianza de las abejas, prestarles los cuidados necesarios con el objetivo de obtener y consumir los productos que son capaces de elaborar y recolectar. El principal producto que se obtiene de esta actividad es la miel.

Los productos de colmena como la miel, la jalea real, el polen, el propóleo, el veneno de abeja, son productos utilizados con fines industriales, de consumo y terapéuticos.

En México, la apicultura genera alrededor de 100 mil empleos directos y se producen más de 57 toneladas de miel al año, siendo Yucatán el principal productor con un aproximado de más de 8 mil toneladas anuales. En cuanto al comercio exterior, la mitad de la producción de miel se canaliza al mercado alemán.

Hoy en México, como hace siglos, el sureste sigue siendo la principal zona de producción de miel. El país ocupa el octavo lugar como productor mundial. (SAGARPA, 2016)

### 1.2 El Propóleo

El propóleo es una mezcla de resinas y secreciones vegetales recolectados por la *Apis mellifera*, mejor conocida como la abeja doméstica (Delgado, 2015), con el fin de proteger de cualquier agente externo a la colmena, de ahí el termino etimológico que proviene del griego “*pro*” (para o la defensa de) y “*polis*” (ciudad) que quiere decir: defensa de la ciudad. (Londoño O. A., 2010)



**Figura 2.** Abeja recolectando resina.

Fuente: SAGARPA, 2010.

La producción propóleo se lleva a cabo por un número reducido de abejas (que tienen más de 15 días de vida), su producción se hace a la temperatura más alta del día. Las antenas de la abeja localizan la partícula de resina más adecuada, después con su mandíbulas la desprende con ayuda de su primer par de patas, también se auxilia de la secreción de sus mandíbulas para ablandar la secreción. La cantidad de propóleo recolectada depende de la raza o colmena, pero en promedio se pueden producir 300 gramos por año en cada colmena. (Jean P., 2007)

Las abejas usan el propóleo en una capa fina en las paredes de las colmenas, utilizan pedazos para tapar huecos, grietas, reparar y fijar cuadros, construyen barreras en la piquera (entrada) de las colmenas como protección a cambios climáticos, entradas de luz, para evitar la pérdida del vapor de agua requerido para el desarrollo de las larvas y como prevención a bacterias y otros microorganismos nocivos en la colmena.

Este uso es muy importante, porque la temperatura interna de la colmena es de aproximadamente 34°C, con una humedad superior a 65%, creando así un ambiente propicio para el crecimiento de microorganismos que podrían crear riesgos a la población; sin embargo, los constituyentes volátiles del propóleo actúan como bactericidas y bacteriostáticos. Es usado para embalsamar cadáveres de intrusos que las abejas no pueden retirar de la colmena, evitando su putrefacción. (Jean P., 2007)

### **1.2.1 Composición**

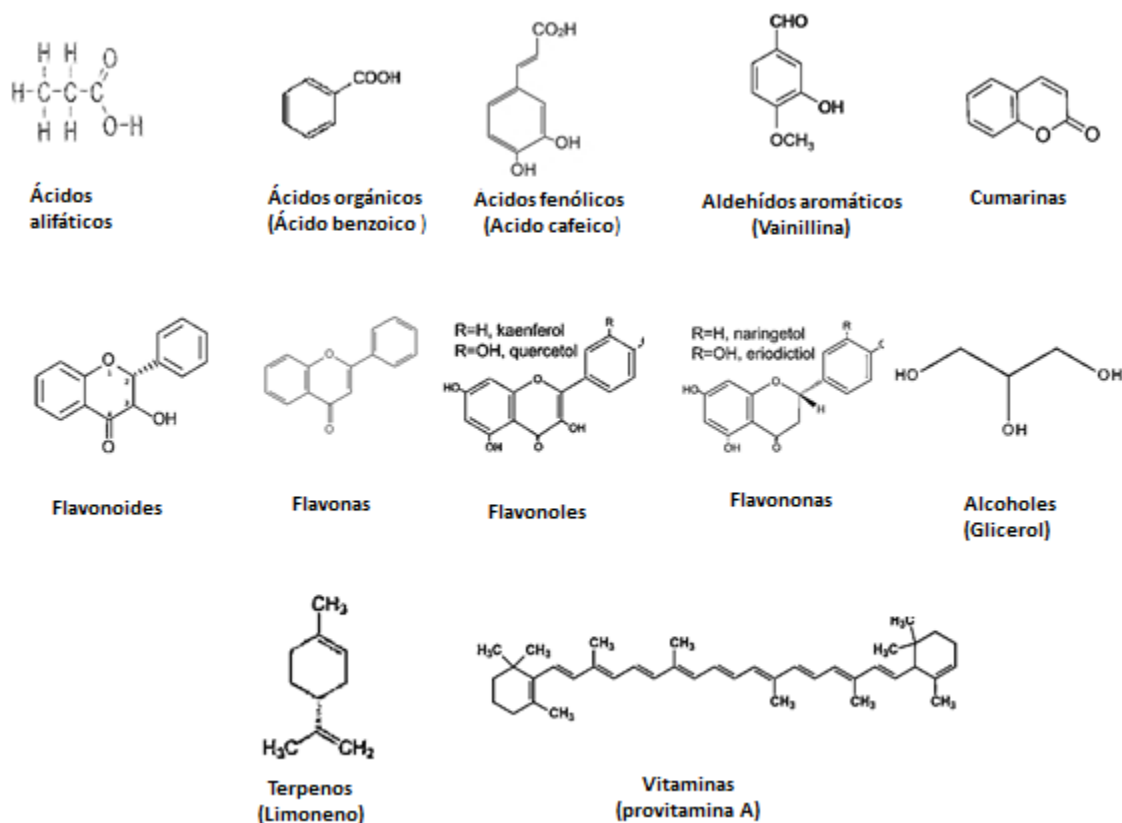
El propóleo es una sustancia compleja la cual tiene una composición química heterogénea, existen tres fuentes para los componentes, los cuales son los materiales añadidos durante su elaboración como: polen, tierra y fibras vegetales. El segundo componente son los productos metabólicos secretados por las abejas como saliva y ceras. La última de las fuente se trata del exudado de plantas recolectadas por las abejas, este es un punto importante ya que la composición depende de la vegetación que predomine alrededor de la colmena, además de su origen geográfico. (Gutiérrez, 2013)

El propóleo en bruto esta generalmente compuesto por el 50% por resinas de plantas, el 30% de ceras, 10% de aceites esenciales y aromáticos, el 5% de polen y 5% de sustancias orgánicas.

La amplia aplicación del propóleo en la medicina moderna ha atraído una atención creciente hacia su composición química. En la actualidad se describen más de 300 componentes químicos. (Rodríguez, 2015)

Los componentes químicos dependen del origen geográfico, el clima, el relieve, la vegetación, las cuencas hidrográficas y otros. En especial la flora específica que rodea a la colmena, que es el sitio de recolección de las abejas, (Gutiérrez, 2011) Se ha informado que el propóleo se obtiene de resinas de álamos, coníferas, abedules, pinos, alisos, sauces, palmeras, *Baccharis dracunculifolia* y *Dalbergia ecastaphyllum*. (Huang, 2014)

El propóleo contiene hidrocarburos, lípidos, ácidos, minerales, flavonoides, terpenos, compuestos fenólicos y sus ésteres, azúcares. Con las investigaciones de los últimos años se ha identificado a los compuestos fenólicos, dentro de los cuales se encuentra los flavonoides, que pertenecen a los compuestos bioactivos por sus propiedades medicinales, en especial a la pinocembrina, galantina y pinobanksina. En la **Figura 3** se observan los compuestos químicos, la mayoría pertenecen al 50% del bálsamo obtenido de las fuentes vegetales.



**Figura 3.** Principales componentes químicos del propóleo.

Fuente: Adaptación de Huang, 2014.

### 1.2.2 Comercialización del propóleo

Los productos desarrollados a base de propóleo se encuentran en el mercado, ya que existen industrias dedicadas a su elaboración de productos naturales y con beneficios para los consumidores. Es así, que las industrias como la farmacéutica, alimenticia y cosmética suelen ocupar este y otros productos provenientes de la abeja.

En países como: Dinamarca, Francia, Alemania, Hungría, Ucrania y Estados Unidos de América son los principales consumidores de propóleo, aunque cabe señalar que este número va en aumento (Martínez, 2004).

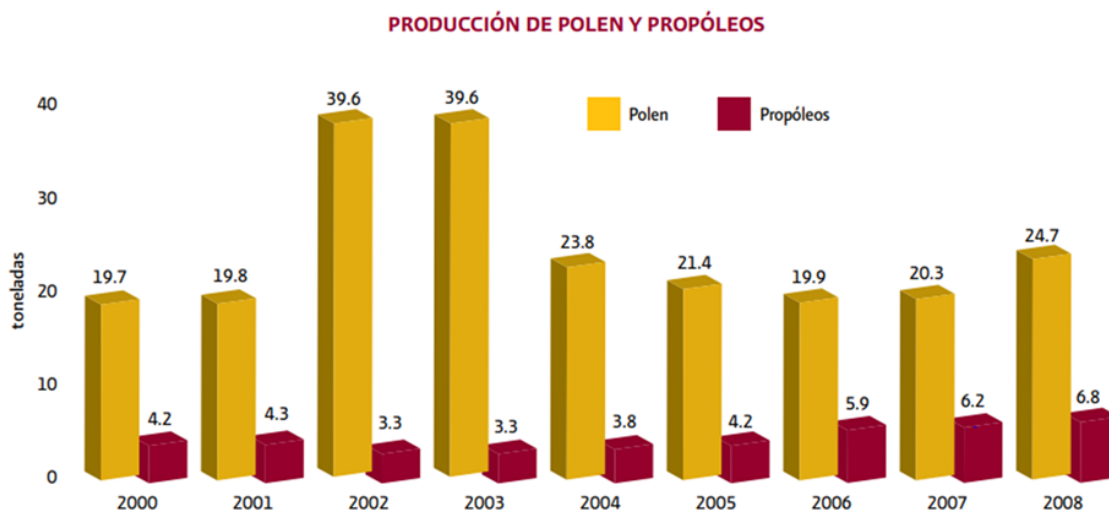
El 6.2% de las patentes corresponden a productos para tratamientos odontológicos. Japón tuvo un crecimiento de 66% en la década de los años 80 a 90 en la productividad del propóleo. De igual modo el precio ascendió de 5 a 200 dólares por kilogramo, para productos de Brasil, los que además de una mejor calidad tendrían menor contenido de metales pesados que el propóleos de otros proveedores. (Peña, 2008)

Los países que destacan en la producción mundial de propóleo son China, Argentina, Brasil, Cuba, Chile, Uruguay y Canadá. En México la situación es distinta, ocupa el quinto lugar de producción de miel, pero no se tiene un mercado de propóleo de peso. (Secretaría de Agricultura Ganadería Desarrollo rural Pesca y Alimentación, 2010)

El manejo del propóleo es artesanal, por tanto, requiere de una amplia difusión de las diferentes propiedades de este producto, para interesar a los productores y empresarios a incursionar en un rubro no tradicional dentro de la actividad apícola. Se considera necesario poner especial énfasis en el manejo y explotación de la colmena, optimizando la producción, para lograr insertar el propóleo chileno en el mercado nacional e internacional (Hernández et al., 2005). En la **Figura 4** se muestran los últimos datos estadísticos confiables que se tiene de la producción del propóleo son de hace 10 años. En el 2008 se observó que la producción en México aumentó, esto nos indica que los apicultores le dieron la importancia de este producto. (SAGARPA, 2010).

Actualmente, existen en el mercado gran variedad de productos con base de propóleo que se comercializan en tiendas y farmacias. Su accesible disponibilidad hace que usar el propóleo sea más fácil. Sin embargo, existe una falta en la regularización. Con el objetivo de establecer los estándares de calidad pertinentes para dicha resina apícola, se estableció la Norma Oficial Mexicana para la Producción y Especificaciones de Propóleos, la cual fue aceptada y

recientemente aprobada por la Comisión Federal de Mejora Regulatoria (COFEMER) y publicada en el Diario Oficial de la Federación el 9 de octubre de 2017 bajo el registro NOM-003-SAG/GAN-2017.



**Figura 4.** Producción de polen y propóleos en México.  
Fuente: SAGARPA, 2010.

La NOM-003-SAG/GAN-2017 en donde se establecen las especificaciones de producción, las características físicas, químicas y antimicrobianas, que deben cumplir los propóleos y sus extractos para su procesamiento y comercialización en el país.

### 1.2.3 Aspectos regulatorios.

En el 2010, la Asociación de Propóleos de Japón implementó las Normas Voluntarias de Propolis, en la cual implementan especificaciones necesarias para su exportación, en ella especifica que análisis físicos y químicos (Japan Council of Propolis, 2010)

Como lo marcan las normas de calidad internacionales, el valor comercial está establecido con base en la calidad del producto y los estándares oficiales, establecidas por las autoridades sanitarias de cada país que tenga normalizado el flujo de este producto de colmena. (Rodríguez, 2015)

En México, los productos de propóleo, no cuentan con una etiqueta reglamentada, ni cuentan con un proceso de calidad, según la Norma IRAM 15935-2, la cual está adecuada para las especificaciones de calidad en extractos de propóleo, indica que los productos deben tener un

porcentaje mayor a 10% de propóleo seco, como es el caso de Argentina, Brasil , Salvador, Cuba las cuales tiene normativas internacionales de calidad para el propóleo expuestas por el IRAM-INTA (Instituto Argentino de Normalización), el Ministerio de Agricultura de Brasil (Reglamento técnico para la fijación de identidad y calidad de propóleos).

#### **1.2.4 Propiedades del propóleo**

Las propiedades terapéuticas del propóleo dependen de los componentes de éste, los cuales se relacionan con su origen geográfico. También depende de su calidad, esto incluye su modo de empleo y el uso de disolventes para su extracción. (Gutierrez, 2011)

Varios estudios han comprobado las siguientes propiedades terapéuticas:

- **Actividad antiinflamatoria:**

Esta acción es atribuida al CAPE y a la quercetina. Actuando a nivel de los macrófagos suprime la producción de prostaglandina y leucotrienos (Noriega, 2014)

- **Actividad antimicrobiana :**

La mayoría de los componentes aislados del propóleo son compuestos polifenólicos, específicamente los flavonoides, estos son bien conocidos por su acción antibacterial, antifúngica y antiviral. Su actividad se relaciona a los flavonoides y los sinergismos entre sus componentes, tales como los ácidos aromáticos, ácidos grasos, ésteres, hidroxiacidos y otros compuestos. La acción antifúngica del propóleo ha sido considerada por numerosos autores , luego que varios concuerdan que los terpenos, sobre todo el bisabol y las flavononas como la pinocembrina son los principales compuestos responsables de esta actividad. (Viloria, 2016) (Londoño et al, 2010).

- **Actividad antioxidante :**

Los flavonoides pueden reducir la formación de radicales libres y por lo tanto pueden tener un efecto protector sobre los lípidos séricos contra la oxidación y otros efectos terapéuticos en un número elevado de patologías. (Rodríguez, 2015)

- **Actividad antitumoral:**

Se ha estudiado que el CAPE que posee el propóleo puede inhibir el cáncer de mama en modelos preclínicos de humanos y ha demostrado que reduce la neovascularización y por tanto, induce la

detención del ciclo celular, la apoptosis y los factores de crecimiento y de transcripción. (Simone, 2017)

- **Actividad inmune:**

Los flavonoides como es el caso de CAPE, participan indirectamente en el mecanismo de inmunidad celular, debido a que estimulan los linfocitos T, estos actúan como segunda línea de defensa del sistema inmune, actuando contra células invasoras.

- **Propiedad anestésica:**

Algunos de los flavonoides del propóleos como la pinocembrina, pinostrobina y ésteres del CAPE, producen efectos anestésicos (Noriega, 2014).

- **Propiedad cicatrizante:**

Está directamente relacionada a la presencia de cobre. Presenta excelentes cualidades como antiséptico, astringente y reestructurante tisular.

### 1.3 Metabolitos secundarios

Hablar de los metabolitos secundarios de las plantas, estos son los compuestos químicos sintetizados por las plantas que cumplen funciones no esenciales para ellas y estos intervienen en las interacciones biológicas entre la planta y el ambiente.

El valor de los metabolitos secundarios fue desconocido, ya que no se le daba importancia. Se les consideraba como productos finales de los procesos metabólicos, sin una función específica, o productos de desecho de las plantas. A finales del siglo XIX y de principios del siglo XX, los químicos orgánicos empezaron a estudiar estas sustancias por su importancia como drogas medicinales, venenos, saborizantes, pegamentos, aceites, ceras, y otros materiales utilizados en la industria.

Los metabolitos secundarios son una fuente de principios activos de medicamentos y de valiosos productos químicos, cuyas aplicaciones farmacéuticas se debe a su función como analgésicos, antibacterianos, antihepatotóxicos, antioxidantes, antivirales, antitumorales, fungicidas, inmunoestimulantes, entre otras. (Velasquez, 2017)

Se ha propuesto que los componentes activos de los extractos (metabolitos secundarios) pueden inhibir el crecimiento microbiano mediante los mismos mecanismos con los que actúan los

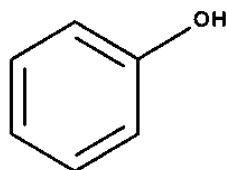
antibióticos: inhibición de la síntesis de la pared celular y la activación de enzimas que destruyen esa pared, aumento de la permeabilidad de la membrana celular, interferencia con la síntesis de proteínas y alteración del metabolismo de los ácidos nucleicos entre otros. (Hernández, 2018)

Posteriormente se describirán detalladamente a los fenoles y flavonoides, estos son los componentes principales del propóleo a los cuales se le atribuyen la mayor de sus propiedades terapéuticas

### 1.3.1 Fenoles

Los fenoles son compuestos químicos ampliamente distribuidos en las plantas como producto de su metabolismo secundario, algunos de los cuales son indispensables para su funcionamiento y otros son útiles en los mecanismos de defensa bajo situaciones de tensión y contra el ataque de organismos patógenos. También se vincula el consumo de estos químicos con beneficios a la salud, debido a sus propiedades antioxidantes y anticancerígenas.

El término compuestos fenólicos engloba a todas aquellas sustancias que poseen varias funciones fenol como se muestra en la **Figura 5**, nombre popular del hidroxibenceno, unido a estructuras aromáticas o alifáticas. (McMurry, 2016)



**Figura 5.** Estructura de los componentes fenólicos.  
Fuente: McMurry, 2016.

Estos compuestos son la contraparte aromática de los alcoholes, pero son más ácidos (pKa 10) debido a que los aniones fenóxido correspondientes están estabilizados por la deslocalización de la carga negativa en el anillo aromático. La sustitución del anillo aromático por un grupo atractor de electrones aumenta la acidez del fenol y la sustitución por un grupo donador de electrones disminuye la acidez. (McMurry, 2016)



El término fenoles comprende aproximadamente 8000 compuestos que aparecen en la naturaleza. Todos ellos poseen una estructura común: un anillo fenol -un anillo aromático que lleva al menos un sustituyente hidroxilo. (Huang, 2014)

Los tres grupos más importantes en los que se dividen los compuestos fenólicos son:

- Flavonoides
- Ácidos fenólicos
- Polifenoles

Los fenoles simples como el fenol, cresol, timol y resocinol, están ampliamente distribuidos en la naturaleza. Igualmente, los ácidos fenólicos como el gálico, vainílico, p-hidroxibenzoico y los aldehídos como la vainillina, también son abundantes en plantas.

### 1.3. 2 Flavonoides

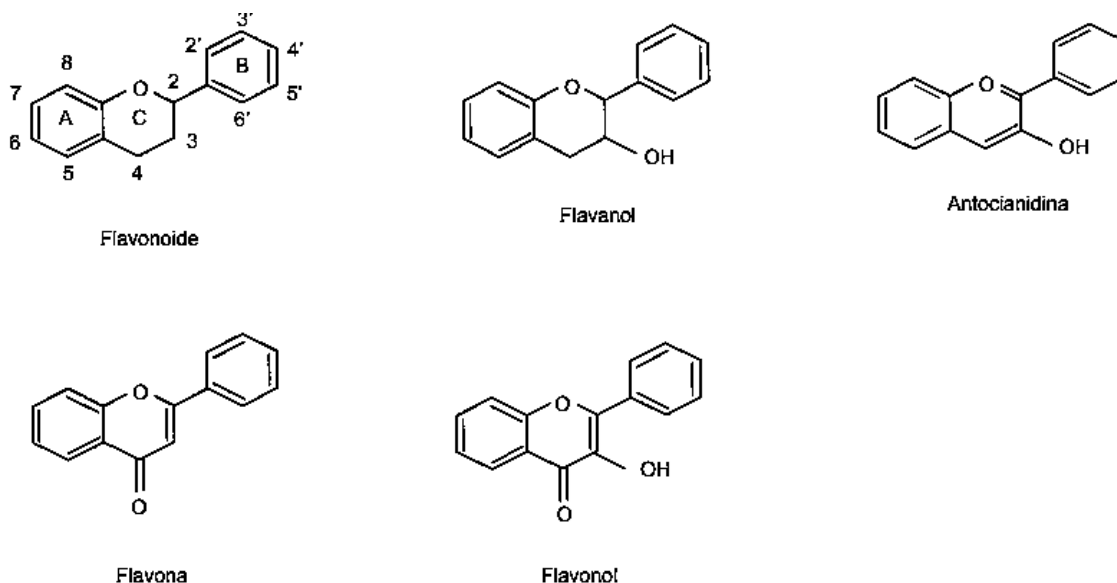
Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenilpiranos. Los flavonoides son derivados fenólicos sintetizados en cantidades substanciales por las plantas. Los átomos de carbono en los anillos C y A se numeran del 2 al 8, y los del anillo B desde el 2' al 6'. (Martínez, 2002)

Comprenden alrededor de 4000 compuestos identificados, son derivados hidroxilados, metoxilados y glicosilados de la 2-fenilbenzopirano, que consiste en dos anillos benceno combinados por mediación del oxígeno contenido en el anillo pirano. (Peñarrieta, 2014)

La actividad de los flavonoides como antioxidantes depende de las propiedades redox de sus grupos hidroxifenólicos y de la relación estructural entre las diferentes partes de la estructura química. Esta estructura básica, **Figura 6**, permite una multitud de patrones de sustitución y variaciones en el anillo C. En función de sus características estructurales se pueden clasificar en:

- **Flavanos:** como la catequina, con un grupo (OH) en posición 3 del anillo C.
- **Flavonoles:** representados por la quercetina, que posee un grupo carbonilo en posición 4 y un grupo hidroxilo en posición 3 del anillo C.
- **Flavonas:** como la diosmetina, que poseen un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y carecen del grupo hidroxilo en posición 3 del anillo C.
- **Antocianidinas.** que tienen unido el grupo hidroxilo en posición 3 del anillo C, pero poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C.

Como los principales componentes del propóleo, los flavonoides contribuyen en gran medida a las actividades farmacológicas de propóleo. Algunos autores consideran que la cantidad de flavonoides se usa como criterio para evaluar la calidad del propóleos. (Huang, 2014)



**Figura 6.** Estructura básica y tipos de flavonoides.

Fuente: Martínez, 2002.

## 2 Hongos filamentosos

El reino *Fungí* representa uno de los más grandes acervos de biodiversidad con actividades ecológicas cruciales en todos los ecosistemas y con una gran variabilidad en morfología y ciclos de vida. Los organismos incluidos en la categoría de hongos son tan diversos que es difícil dar una diagnosis diferencial concisa, pero pueden ser descritos como organismos, en su mayoría, filamentosos con crecimiento apical, eucarióticos, aclorófilos, heterótrofos por absorción, con reproducción asexual y sexual por medio de esporas, y con pared celular principalmente constituida por quitina o celulosa. (Aguirre, 2014)

### 2.1 Generalidades del genero *Aspergillus*.

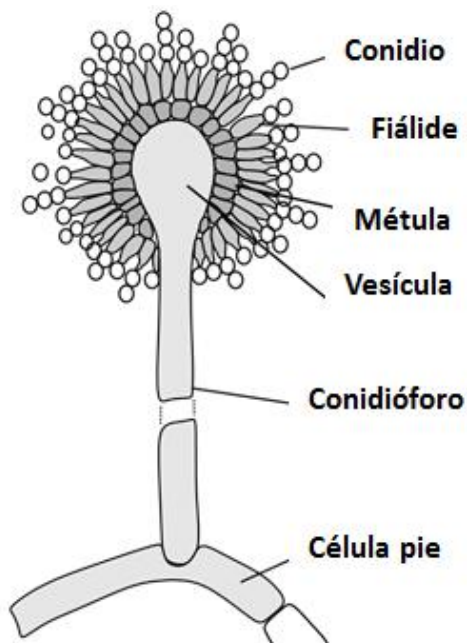
En 1729 el italiano llamado Pier Antonio Micheli, catalogó a *Aspergillus*, usando el término de "*Aspergillum*" ya que este hongo se parece a un instrumento usado para dispersar agua bendita. Esto fue registrado en su obra *Nova Plantarum Genera*. (Masayuki, 2010)

El *Aspergillus* es un hongo ampliamente difundido en la naturaleza que se desarrolla en vegetales en descomposición, granos de cereal, heno, tejidos de algodón, lana y plumas. Su medio ideal son los ambientes oscuros, húmedos y cerrados. Podemos encontrar esporas de *Aspergillus* en los depósitos de trigo, en los edificios en construcción, en los aparatos de aire acondicionado y en los alimentos enmohecidos. (Curbelo, 2015)

Considerado hasta el momento como una causa inusual de infección, el género *Aspergillus* se ha revelado como una causa importante de morbilidad y mortalidad en pacientes inmunocomprometidos. Esta población en expansión se compone de pacientes que padecen neutropenia prolongada, infección por VIH avanzada e inmunodeficiencia hereditaria y de pacientes sometidos a trasplante alogénico de células madre hematopoyéticas (TCMH) o a trasplante pulmonar. (Walsh, 2008)

## 2.2 Morfología de las especies de *Aspergillus*.

*Aspergillus* es un hongo filamentoso hialino, saprófito, perteneciente al filo *Ascomycota*. De ascosporas en el interior de ascas y asexual caracterizada por la producción de hifas especializadas denominadas conidióforos, sobre los que se encuentran las células conidiógenas llamadas fiálides a partir de las cuales se forman las esporas asexuales llamadas conidios (**Figura 7**). El conidióforo característico de *Aspergillus*, aunque sea una estructura unicelular posee tres partes: vesícula (extremo apical hinchado), estípite o conidióforo (sección cilíndrica situada debajo de la vesícula) y célula pie (sección final a veces



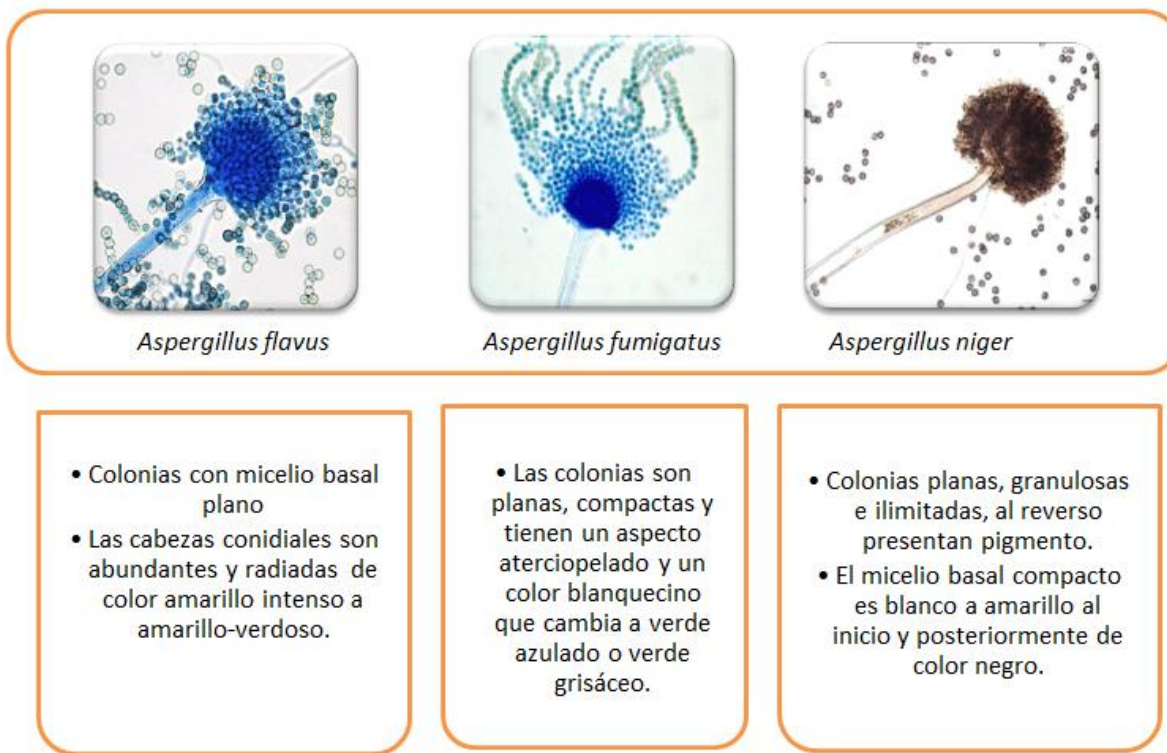
**Figura 7.** Estructuras morfológicas de la especie *Aspergillus*.

Fuente: Adaptación de Bonifaz, 2015.

separada por un septo que une al conidióforo con el micelio. (Bonifaz A., 2015)

Sobre la vesícula se disponen las fiálides, en muchas especies, entre la vesícula y las fiálides se encuentran otras células estériles denominadas métulas. Las cabezas conidiales que solo presentan fiálides se denominan uniseriadas y las que presentan fiálides y métulas se llaman

biseriadas. (Abarca, 2000). En la **Figura 8** se muestra las características morfológicas para poder diferenciar entre los tres géneros de *Aspergillus*.



**Figura 8.** Características morfológicas de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus* y *Aspergillus niger*.  
Fuente: Adaptación de Bonifaz, 2015.

### 2.3 Importancia de *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus* y *A. niger*.

En los últimos años ha aumentado la frecuencia de infecciones por *Aspergillus spp.* Principalmente en los pacientes receptores de trasplante de médula ósea probablemente como resultado de la profilaxis con fluconazol, lo que incrementa la colonización por hongos resistentes al mismo y su virulencia. (Caston Osorio J.J., 2008)

La aspergilosis ocurre en el 3% de los pacientes con trasplante de médula ósea y en el 1.3% de los pacientes con trasplante hepático. La mortalidad global va del 30 al 83%. (Kontoylannis D.P., 2010). En países como México, Perú, Argentina y Francia se ha mostrado una excelente susceptibilidad a itraconazol, voriconazol y anfotericina B. (Sifuentes Osomio J., 2012).

*Aspergillus fumigatus* es la especie aislada con mayor frecuencia de los casos de aspergilosis invasiva. Las especies que le siguen en frecuencia son *A. flavus*, *A. niger* y *A. terreus*. (La Sociedad

de enfermedades Infecciosas de los Estados Unidos de América, 2008) Ocasionalmente en algunas instituciones muestran predominio en *A. flavus* o *A. terreus*

#### 2.4 Manifestaciones clínicas

La aspergilosis es una micosis causada por un género ubicuo y de bajo poder de patogenicidad. La invasión puede estar localizada y afectar un solo órgano o tejido, o bien, ser sistemática. El grado de diseminación depende la gravedad y de los factores predisponentes como poder ser cáncer, quemaduras, desnutrición, personas inmunocomprometidas. (La Sociedad de enfermedades Infecciosas de los Estados Unidos de América, 2008)

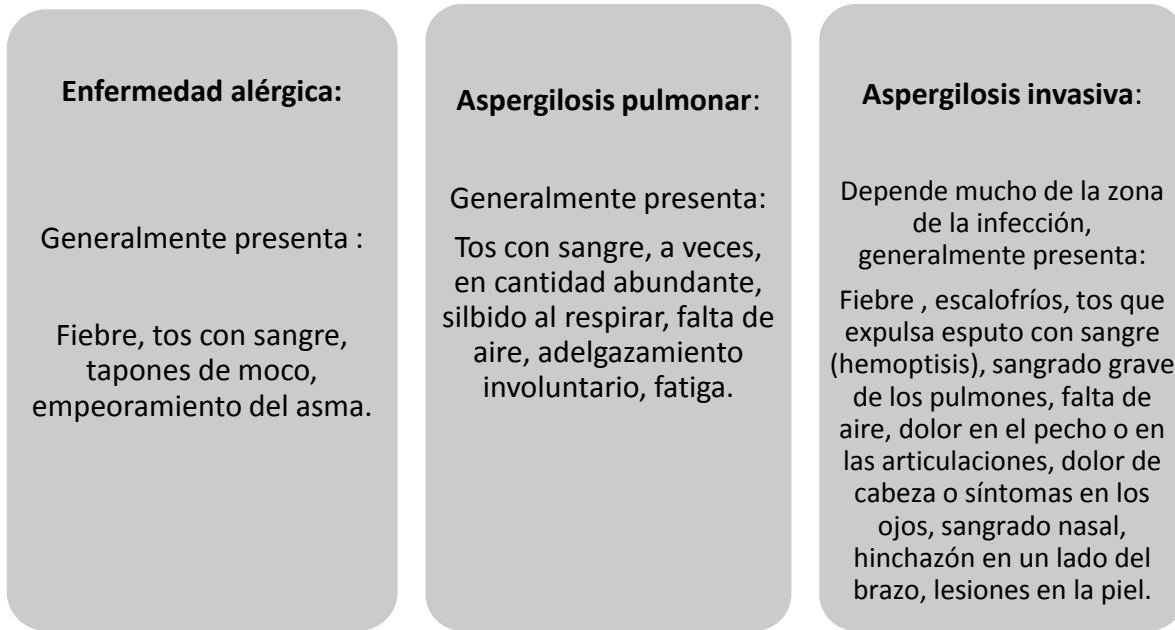
La Aspergilosis se manifiesta con tres entidades clínicas principales

- Enfermedad alérgica
- Aspergiloma pulmonar
- Aspergilosis invasiva

Cuando *Aspergillus* spp. causa desordenes de hipersensibilidad, se trata de una enfermedad alérgica, ya que se refiere a que las condiciones inmunológicas en la que los pacientes generan una respuesta anormal de inflamación y síntomas mediados por IgE. En este caso los hongos pueden iniciar la respuesta inmune a través de los PRR's con PAMP's o DAMP's. (Thomas, 2008)

El asma, rinitis alérgica, neumonitis por hipersensibilidad o rinosinosis alérgica fúngica son las enfermedades que pueden adquirirse por mohos de la especie *Aspergillus* sp. La sintomatología con lleva a episodios recurrentes de obstrucción bronquial en pacientes asmáticos con fiebre, malestar, expectoración en moldes mucosos oscuros, eosinofilia y hemoptisis. En la **Figura 9** se muestran los síntomas más comunes. El aspergiloma es una masa en una cavidad pulmonar, que se crea por una afección previa, como fibrosis quística o tuberculosis. (Kontoylannis D.P., 2010)

La aspergilosis pulmonar de tipo invasivo es una infección grave con neumonía y que se puede diseminar a otras partes del cuerpo. La infección ocurre con más frecuencia en personas con sistemas inmunitarios debilitados debido al cáncer, VIH/SIDA, leucemia, trasplante de órganos, quimioterapia, medicamentos que reducen la cantidad de glóbulos blancos normales o debilitan el sistema inmunitario u otras afecciones. (Caston Osorio J.J., 2008) (Sifuentes Osomio J., 2012)



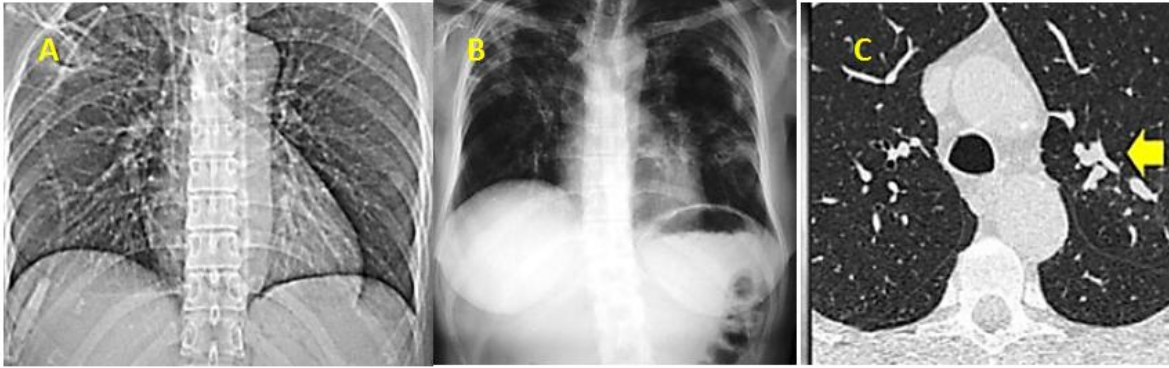
**Figura 9.** Síntomas de Aspergilosis.  
Fuente: Adaptación de Bonifaz, 2015.

## 2.5 Diagnóstico

El diagnóstico de la aspergilosis suele ser difícil y requiere la demostración de *Aspergillus* sp. en biopsias o cultivos, aunque el riesgo de contaminación por hongos del ambiente es alto sobre todo en las personas que en su trabajo tienen contacto con un ambiente contaminado de *Aspergillus* spp. (Aguirre, 2014)

En caso de una aspergilosis se realiza una radiografía donde se encuentran hallazgos los más comunes en la cavidad en forma de media luna y en casos escasos se encuentra el engrosamiento de la pared de la cavidad o pleura adyacente, las posiciones corroborar un cambio de posición del Aspergiloma puede ser móvil, en otras se observan filamentos de hongos entrelazados, atrapan aire, dan aspecto esponjiforme que rellena una cavidad como se encuentra en la **Figura 10**.

**Análisis microbiológico:** Si hay exudados se debe hacer examen directo, frotis y cultivo. El examen directo aclarado con hidróxido de potasio o teñido con un colorante simple, en ocasiones permite visualizar las hifas hialinas, septadas y las cabezas aspergiliares. (Bonifaz A., 2015)



**Figura 10.** Hallazgos topográficos de Aspergilosis. (A) Se observa Aspergiloma sin cavidades (B y C) Aspergilosis broncopulmonar alérgica: imagen de “dedo de guante” en un paciente con asma y eosinofilia periférica. Fuente: Torra, 2014.

**Análisis inmunológico:** En pacientes con inmunidad normal, o bien, pacientes alérgicos podemos buscar anticuerpos. Existen pruebas de precipitación en gel donde la presencia de una o más bandas de precipitación, se consideran diagnósticas. La técnica de ELISA es también un buen método inmunológico para detectar anticuerpos específicos. También se usa la detección del antígeno galacto-manano que tiene un rendimiento del 80%, se considera diagnóstico para niveles superiores a 0.5-0.8 nanogramos por mililitro, siendo además, indicación de tratamiento precoz (aún sin clínica). Este test puede ser falsamente positivo en algunos pacientes que hayan recibido poco tiempo antes algunos antibióticos, productos intravenosos que contengan gluconato o una transfusión de plaquetas. (Thomas, 2008)

**Análisis de técnicas moleculares:** Debido a la dificultad que representa detectar antígenos o anticuerpos contra *Aspergillus*, desde 2002 se ha intentado hacer diagnóstico molecular. En los primeros ensayos se utilizaba la ampliación por PCR de subunidades ribosomales altamente conservadas en hongos filamentosos, incluido el género *Aspergillus*. Recientemente se ha logrado secuenciar un fragmento de DNA de *A. fumigatus* de un kb, con este se ha logrado detectar aspergilosis de manera temprana. Una limitante a estas técnicas son los falsos positivos. (J. A. Sugui, 2010)

## 2.6 Tratamiento

**Aspergilosis broncopulmonar alérgica:** en las exacerbaciones se utilizan glucocorticoides para alivio sintomático y el Itraconazol (200 mg por 16 semanas) ha demostrado reducir de forma significativa la necesidad de corticoides, mejorando la función pulmonar.

**Aspergiloma:** Este cuadro no responde a la terapéutica antimicótica. Se trata mejor con medidas conservadoras a menos que ocurra hemoptisis masiva, en cuyo caso está indicada la resección quirúrgica pulmonar. (Caston Osorio J.J., 2008) (Espinell-Ingroff, 2018)

**Aspergilosis invasiva:** Como tratamiento primario se ocupa el Voriconazol, el cual es un agente antifúngico triazólico. El mecanismo de acción principal es la inhibición de la desmetilación del 14 alfa-lanosterol mediado por el citocromo P-450 fúngico, que constituye un paso esencial en la biosíntesis de ergosterol fúngico. La acumulación de 14 alfa-metil esteroides, se correlaciona con la subsiguiente pérdida de ergosterol en la membrana celular fúngica y puede ser responsable de la actividad antifúngica. Ha demostrado ser más selectivo para las enzimas del citocromo P-450 fúngico que para los sistemas enzimáticos del citocromo P-450 de varios mamíferos. (EMEA, 2008)

Como tratamiento alternativo se utiliza Anfotericina B, en formulaciones lipídicas. Itraconazol o Caspogunfina. Los compuestos aprobados por la FDA, que se enumeran a continuación, tienen actividad *in vitro*, *in vivo* y clínica contra el género *Aspergillus* y disponen de licencia para el tratamiento de la aspergilosis invasiva: D-AMB y sus formulaciones lipídicas (complejo lipídico de AMB [ABLCL], LAMB y suspensión coloidal de AMB [ABCD]), itraconazol, voriconazol, posaconazol y caspofungina. (La Sociedad de enfermedades Infecciosas de los Estados Unidos de América, 2008)

El voriconazol y la D-AMB son los únicos compuestos con licencia en los Estados Unidos para el tratamiento primario de la aspergilosis invasiva.

### 3 Antifúngicos

El concepto de antifúngico o antimicótico engloba cualquier sustancia capaz de producir una alteración tal de las estructuras de una sustancia fúngica que consiga inhibir su desarrollo alterando la viabilidad o capacidad de supervivencia, bien directa o indirectamente, lo que facilita el funcionamiento de los sistemas de la defensa del huésped.



### 3.1 Clasificación de los antifúngicos.

Los antifúngicos incluyen una amplia variedad de sustancias con diferentes estructuras químicas y mecanismos de acción. La clasificación se realiza según los criterios que consideran a su estructura en: polienos, azoles, alilaminas, entre otros; de acuerdo con su origen en sustancias producidas por organismos vivos o derivados de la síntesis química: de acuerdo con su espectro de acción en: amplio, restringido y de acuerdo con el sitio de acción. (**Tabla 1**)

**Tabla 1.** Clasificación de los antifúngicos por su estructura.

Fuente: Adaptación de Nolasco, 2011.

GRUPOS	Antimicóticos	Sitio de acción
Polienos	Nistamina , natamicina , anfotericina B.	Membrana celular
Azoles	• Imidazol, miconazol, clotrimazol, ketoconazol • Triazoles : fluconazol, itraconazol. • Triazoles de segunda generación : voriconazol, ravuconazol, posaconazol.	Membrana celular
Alilaminas	Terbinafina , naftifina	Membrana celular
Lipopéptidos	• Papulacandinas • Triterpenos glicosilados • Equinocandinas, caspofungina, anidulofungina, micafungina	Pared celular
Pirimidinas fluoradas	Flucitoxina	Núcleo

### 3.2 Mecanismo de acción

La gran similitud entre las células mamíferas y fúngicas resulta un problema al diseñar la molécula antifúngica, pues esta debe ser selectiva con la célula patógena y no con la célula sana. El mecanismo de acción de los medicamentos que inhiben el crecimiento de hongos, depende del lugar en el que actúen, lo cual está relacionado con la estructura química del antifúngico. (Scott A W, 2010)

- ***Acción sobre la membrana celular del hongo***

El contenido de esterol de la célula fúngica y mamífera es diferente. En las células de los mamíferos el colesterol es el que predomina y en las células fúngicas es el ergosterol. La diferencia

del contenido de esteroides ha sido explorada como blanco de acción en los medicamentos antifúngicos. Dentro de ellos se tienen a los polienos, azoles y alilaminas. (Scott A W, 2010)

**Polienos.** Los medicamentos que se encuentran en este grupo , se unen al ergosterol presente en la membrana celular fúngica ver **Figura 11**, donde se forman poros que afectan la permeabilidad de la membrana lo que permite una pérdida de proteínas, glúcidos y cationes monovalentes y divalentes causando la muerte celular. (EMEA, 2008)

**Azoles.** Estos inhiben al citocromo P-450-3-A de la célula fúngica a través de la inactivación de la enzima C14- $\alpha$ -dimetilasa, con lo cual se interrumpen la síntesis del ergosterol en la membrana celular. Debido a la falta de ergosterol se comienza acumular esteroides tóxicos intermedios ocasionando la permeabilidad de la membrana y de esta forma se interrumpe el crecimiento del hongo. ( Campsa, 2009)

**Alilaminas.** Su mecanismo es similar a los azoles, este tipo de antifúngicos inhiben la síntesis del ergosterol, inhibiendo a la enzima escualeno epoxida provocando el aumento en los niveles de escualeno, la permeabilidad de la membrana celular. (Scott A W, 2010)

- **Antifúngicos que actúan sobre la pared celular del hongo**

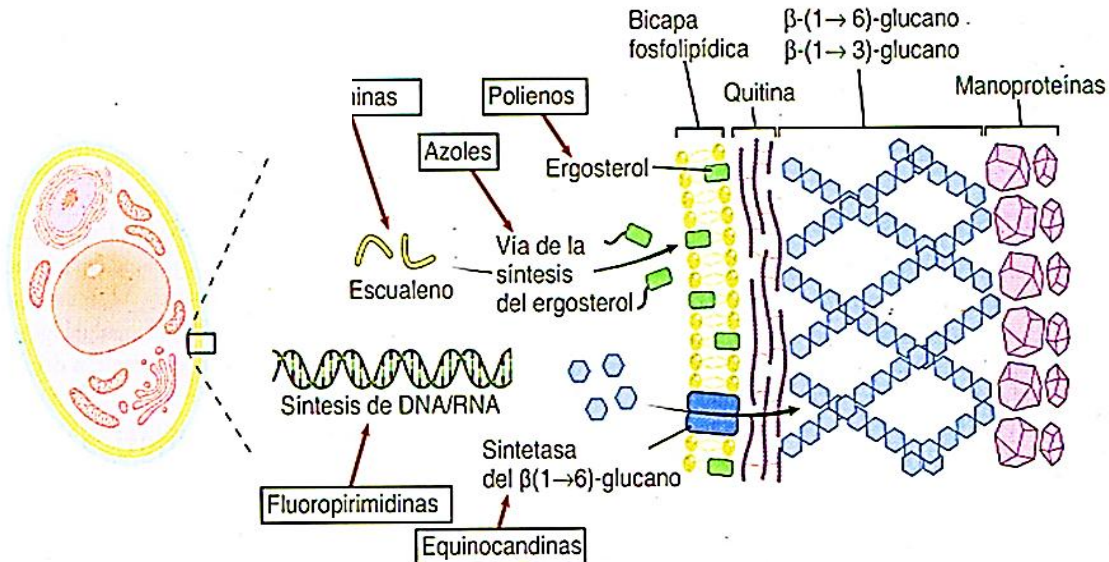
**Lipopéptidos.** Desde el punto de vista estructural, la pared celular de los hongos está compuesta de un complejo proteico y polisacárido cuya composición varía en dependencia de la especie de hongo. La distribución de estas proteínas y carbohidratos en la matriz está en relación con la función de la pared celular y los procesos de osmosis y lisis. Los antifúngicos que actúan sobre ella lo hacen inhibiendo la síntesis de los glucanos a través de la inactivación de la enzima 1,3-beta-glucano sintetasa. La falta de glucanos en la pared celular la vuelve débil e incapaz de soportar el estrés osmótico, por lo que muere.

- **Antifúngicos que actúan sobre el núcleo de la célula fúngica**

**Antimetabolitos.** Un clásico antimetabolito es la fluocitosina o 5-fluorocitosina. Este fármaco es transportado por la citosina permeasa en el citoplasma de la célula fúngica, donde se convierte en 5-fluorouracil (5-FU) por la citosina diaminasa. El 5-FU es fosforilado e incorporado dentro del RNA convirtiéndose en el dexosinucleotido, el cual inhibe a la timidilato sintetasa y de esta forma impide la síntesis de proteínas de la célula. También inhibe la síntesis de la proteína fúngica, reemplazando el uracil con 5-FU en el ARN fúngico. (Scott A W, 2010)

### 3.3 Relación estructura-actividad de los antifúngicos.

La presencia de ciclos de 5 átomos en los cuales el nitrógeno o azufre forman parte del ciclo, pudiera considerarse un grupo farmacóforo, pues en ausencia de éste, las moléculas pierden su actividad biológica contra los hongos. (Scott A W, 2010)



**Figura 11.** Síntesis de membrana celular del hongo y señalización de los blancos de agentes antimicóticos.

Fuente: Scott, 2010.

En muchos casos la aparición de anillos bencénicos con sustituyentes halogenados como cloro o flúor, cercanos al anillo de imidazol o triazol, ayudan a aumentar la respuesta biológica de la molécula, pues le confieren lipofilia y mayor eficiencia frente a infecciones fúngicas, ejemplo que se aprecia en los azoles. (Camps, 2009)

Las pirimidinas constituyen otro grupo con actividad antifúngica a partir del cual se pudieran diseñar muchos fármacos de igual actividad farmacológica. (Sifuentes Osomio J., 2012)

Las estructuras que forman ciclos en los cuales se repite el grupo amida también le confieren a la molécula actividad antifúngica, tal es el caso de los lipopéptidos.

Otra estructura que ha servido para el diseño de moléculas antifúngicas es aquella que contiene planos ortogonales, llamadas espirocompuestos. (Bonilla, 2018)

Ante el diseño de fármacos con actividad biológica, los estudios QSAR son de gran importancia así como los de susceptibilidad, la unión de todos garantiza el desarrollo indetenible de agentes antifúngicos, el cual es cada vez más acelerado debido a las infecciones resistentes de muchos hongos.

#### **4 Justificación**

El propóleo es un producto que tiene una variedad de actividades biológicas, hoy en día se comercializa el propóleo en muchas presentaciones, sin embargo, no se tiene un control de calidad para las diferentes presentaciones que se tienen a la venta en México.

Este proyecto busca evaluar productos comerciales a base de propóleo contra especies *Aspergillus*, considerando que este género se encuentra dentro de los principales contaminantes ambientales e importantes productores de micotoxinas que son dañinas para la salud y para productos alimenticios.

#### **5 Hipótesis**

Si se evalúan los productos comerciales de propóleo de acuerdo con la NOM-003-SAG/GAN-2017 y los productos evaluados entran en los parámetros de calidad, entonces, tendrán una acción antimicótica contra *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus* y *Aspergillus niger*.

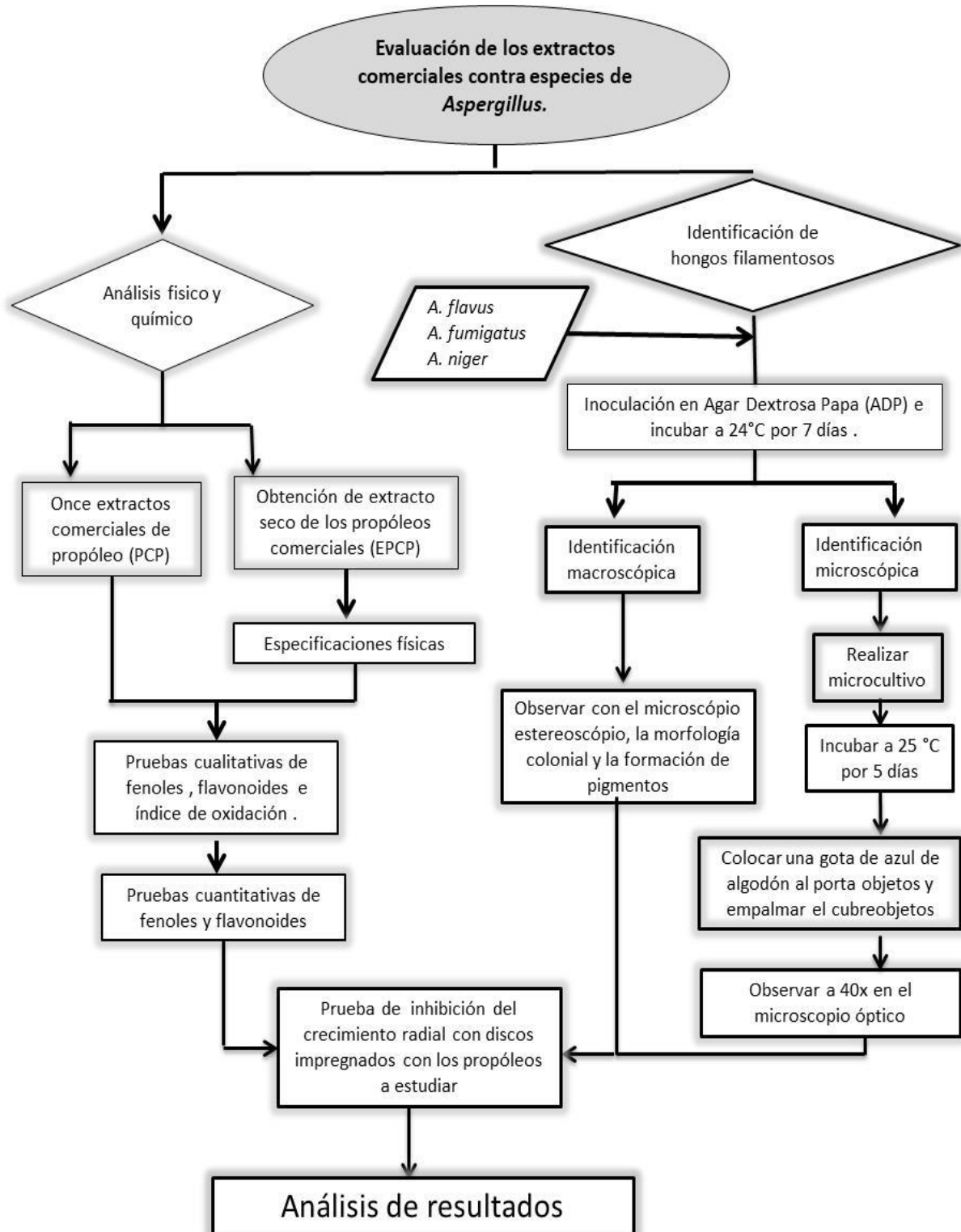
#### **6 Objetivo general**

Evaluar la actividad antifúngica de extractos etanólicos y secos de propóleos comerciales mexicanos contra *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus* y *Aspergillus niger* para demostrar la eficacia de dicho producto.

##### **6.1 Objetivos particulares**

- Obtener el extracto seco a partir de tinturas comerciales de propóleo.
- Realizar el perfil químico de las muestras a evaluar.
- Evaluar el efecto de inhibición de crecimiento sobre *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus* y *Aspergillus niger* de la muestra original y del extracto seco.
- Comparar los resultados de las pruebas químicas y la evaluación antifúngica de la muestra original y del extracto seco.

## 7 Metodología



### 7.1 Materiales y métodos

Se utilizaron 11 productos comercial de propóleo (PCP) provenientes de la República Mexicana, los cuales fueron proporcionados por el Laboratorio 6 de Bioprospección Microbiológica de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria (UIM) en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (FESC) UNAM. En la **Tabla 2** se muestra el lugar de origen de cada extracto comercial.

**Tabla 1. Lugar de origen de los extractos de propóleos comerciales.**

<b>No. muestra</b>	<b>Lugar de origen</b>
<b>1</b>	<b>Ciudad de México, México</b>
<b>2</b>	<b>Ciudad de México, México</b>
<b>3</b>	<b>Morelos, México</b>
<b>4</b>	<b>Ciudad de México, México</b>
<b>5</b>	<b>Estado de México, México</b>
<b>6</b>	<b>Chiapas, México</b>
<b>7</b>	<b>Tabasco, México</b>
<b>8</b>	<b>Michoacán, México</b>
<b>9</b>	<b>Michoacán, México</b>
<b>10</b>	<b>Querétaro, México</b>
<b>11</b>	<b>Veracruz, México</b>

### 7.2 Obtención del Extracto de los Productos Comerciales

Se concentraron los productos comerciales de propóleo con el objetivo de la eliminación total del etanol, para obtener el extracto seco de propóleo comercial (EPCP), para esto se tomó una alícuota de 5 mL del primer producto y se realizó una destilación a presión reducida. (**Ver anexo 1**)

La alícuota se concentró utilizando un Rotavapor (SM-100 PRO) con 50 rpm (revoluciones por minuto) y 70 °C en el caso de las muestras 4, 6, 8, 9 y 10 al no tener el resultado de sequedad total se procedió a evaporar estas muestras en baño maría a 40 °C. (Ruiz, 2015) (NOM-003-SAG/GAN-2017)

### 7.3 Especificaciones físicas

Las especificaciones físicas se realizaron de acuerdo a lo establecido en la NOM-003-SAG/GAN-2017. Se determinó aroma, color, sabor y su consistencia a temperatura ambiente.

### 7.4 Especificaciones químicas

- **Pruebas cualitativas**

A los once productos de propóleo comerciales se les realizó la determinación de tres pruebas cualitativas para detectar la presencia de fenoles y flavonoides, así como determinar su índice de oxidación. Estos análisis químicos fueron realizados usando la metodología propuesta por la Norma Oficial Mexicana NOM-003-SAG/GAN-2017.

#### **7.4.1 Presencia de fenoles**

En un frasco se agregó 1 mL de agua destilada, una gota del producto comercial y posteriormente se adicionó 1 gota de Cloruro Férrico al 1% ( $\text{FeCl}_3$ ), se realizó este procedimiento para cada muestra y observar el cambio de color azul, violeta, púrpura, verde, rojo o marrón, indicando la presencia de fenoles. (NOM-003-SAG/GAN-2017)

#### **7.4.2 Presencia de flavonoides**

Para el aislamiento de flavonoides se recurre a la extracción con solventes de polaridad creciente o directamente con alcalinos por esa razón la reacción que hace el propóleo en contacto con hidróxido de sodio ( $\text{NaOH}$ ) se presente un color amarillo intenso, característico de los flavonoides. (Rodríguez, 2015)(NOM-003-SAG/GAN-2017)

Se realizó esta prueba con los extractos de propóleo comerciales, agregando una gota de este a 1 mL de etanol al 70% y se debe mezclar perfectamente. Se añade una gota de  $\text{NaOH}$  al 20% y se observa un cambio de coloración amarilla y en formación de un precipitado. (NOM-003-SAG/GAN-2017)

#### **7.4.3 Índice de oxidación**

El permanganato de potasio ( $\text{KMnO}_4$ ) es un agente oxidante de color violeta intenso formado por iones potasio ( $\text{K}^+$ ) y permanganato ( $\text{MnO}_4^-$ ), que se vuelve incoloro al reducirse al catión  $\text{Mn}_2^+$  en una solución ácida, a esta determinación se le denomina índice de oxidación y es evaluada de manera visual. (Rodríguez, 2015)(NOM-003-SAG/GAN-2017)



- **Pruebas cuantitativas**

Para determinar la cantidad de compuestos fenólicos y flavonoides, se utilizaron los productos comerciales a base propóleo de forma directa y con el extracto de propóleo seco.

En las dos pruebas se desarrolló una curva de calibración utilizando una solución estándar de ácido gálico para la determinación de compuestos fenólicos y para la determinación de flavonoides se utilizó quercetina. Las curvas de calibración se muestran en los Anexos 2 y 3.

### ***7.5 Determinación de compuestos fenólicos (Método de Folin-Ciocalteu)***

Este procedimiento se realizó de la siguiente manera: Se prepararon soluciones de concentración 0.05 mg/mL de cada una de las muestras originales y de los extractos secos. Se tomó 1 mL de cada muestra y se adicionaron 500 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu, que dejó reaccionar por 5 minutos, se continuó la reacción adicionando 1.5 mL de la solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y aforó con agua destilada hasta un volumen de 10 mL. (NOM-003-SAG/GAN-2017)

### ***7.6 Cuantificación de flavonoides***

El principio básico del método colorimétrico de cloruro aluminio, es que éste forma complejos estables de ácidos con el grupo cetona en C-4 o bien el grupo hidroxilo en C-3 o C-5 de flavonoides. Además, también forma complejos lábiles ácidos con los grupos hidroxilo en el anillo A o B de los flavonoides. Este procedimiento se llevó a cabo con el producto comercial directo y el extracto comercial del producto comercial.

Se preparó curva de calibración a partir de la solución estándar de quercetina de 1 mg/mL, se prepararon concentraciones seriadas de 1 a 40 µg/mL (ppm). (Anexo 3)

En la NOM-003-SAG/GAN-2017 indica que se debe tomar 1 mL de la muestra y agregar 1 mL de metanol grado reactivo. Después se adicionaron 3 mL de la solución de AlCl<sub>3</sub>, esperar 10 minutos a que se lleve a cabo la reacción. Determinar la absorbancia a 415 nm por espectrofotometría de absorción UV-Vis. y estimar la concentración por extrapolación sobre la gráfica obtenida de la curva de calibración. (NOM-003-SAG/GAN-2017)

### ***7.7 Pruebas microbiológicas***

#### ***7.7.1 Microorganismos***

Se emplearon tres diferentes aislamientos del género *Aspergillus*. Las especies de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus* y *Aspergillus niger* a partir de muestras clínicas fueron donadas por el

Laboratorio de Bioprospección Microbiológica de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (FESC), UNAM.

### **7.7.2 Preparación de los hongos filamentosos**

Se realizó un sembrado de las tres especies de *Aspergillus* en Agar Papa Dextrosa (ADP) y se incubaron por 7 días a 25°C.

### **7.7.3 Identificación macroscópica**

Se observó con un microscopio estereoscópico, la morfología colonial y la formación de pigmentos en las tres especies de *Aspergillus*.

### **7.7.4 Identificación microscópica**

Se preparó el sistema de microcultivo (caja Petri, triángulo de vidrio, portaobjetos y cubreobjetos estéril) y se fragmentó con ayuda de un bisturí, la placa de ADP en cuadros de 1.5x 1.5 cm y se colocó un cubo en portaobjetos y con una asa en “L” sembrar el hongo por los cuatro lados del medio ADP, se coloca el cubreobjetos sobre el cubo de medio de cultivo y a la caja Petri se le agrega 10 mL de agua glicerinada (5%) y se termina sellando la caja con parafilm. Incubó a 25°C por 7 días. Pasado este tiempo, se colocó una gota de azul de algodón en el portaobjetos y se emplamó el cubreobjetos, para observar en el microscopio óptico Leica a 40x. Se realizó este procedimiento para cada especie de trabajo.

### **7.7.5 Prueba de inhibición del crecimiento radial**

Esta es una prueba cualitativa que únicamente reflejé si la muestra a evaluar, inhibe el crecimiento microbiano. Los PCP y los EPCP se colocan en sensidiscos y difundirá sobre la placa de agar; si hay inhibición del crecimiento del microorganismo a evaluar se observará la formación de medias lunas. (Londoño, 2008; Rodríguez, 2015)(NOM-003-SAG/GAN-2017)

#### **7.7.5.1 Preparación de sensidiscos**

Se emplearon discos de papel Whatman No. 5, de 5 mm de diámetro (previamente esterilizados). Los discos se impregnaron con 10 µL de cada uno de los once PCP y de las once soluciones de EPCP (160 mg/100 µL) para que tengan una concentración de 16 mg y se dejaron secar a temperatura ambiente por 24 horas. (NOM-003-SAG/GAN-2017)

### **7.6.5.2 Inoculación de las placas**

Se prepararon placas de Agar Dextrosa Sabouraud (SDA) suplementado con 2% de glucosa y 0.5 µg/mL de azul de metileno en cajas Petri (100 x 15mm). (NOM-003-SAG/GAN-2017). En la parte central de las placas, se inoculó las especies a trabajar. Dicho inóculo fue obtenido a partir de la preparación de estos hongos filamentosos, las cuales se perforaron con ayuda de un tubo de vidrio con un diámetro interno de 5mm, esto con fin de estandarizar el inóculo.

Posteriormente en una de las cajas, a 1.5 cm de distancia del inóculo, se colocaron tres discos impregnados de cada muestra y un disco impregnado con etanol al 70%, utilizado como testigo negativo. De la misma forma se realizó con los diez PCP restantes y los once EPCP.

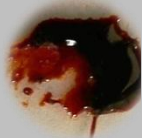
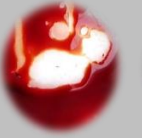




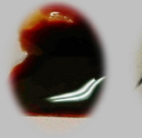

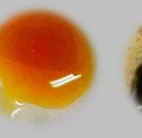

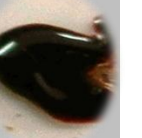
Como control positivo se utilizaron discos de Nistatina 100 µg (BIO-RAD), Econazol 50 µg (BIO-RAD), Clotrimazol 50 µg (BIO-RAD) y Voriconazol 1 µg (BIO-RAD).

## **8 Resultados y discusión**

De los 11 productos comerciales de propóleo se obtuvieron los extractos secos, que se analizaron conforme a la NOM-003-SAG/GAN-2017. En la **Tabla 3** se muestra la apariencia y las especificaciones sensoriales de las 11 muestras de propóleo seco obtenido de los productos comerciales a base de propóleo.

La normatividad internacional existente en Brasil, Argentina y Japón establecen un mínimo de 11, 10 y 8% para el contenido de extracto blando de propóleo en los productos comerciales; en México no existe una estandarización en la elaboración de este producto apícola comercializado debido a esto estos productos que son sacados al mercado como productos artesanales y no cuentan con procesos de calidad adecuados como lo marca las normativas internacionales.

**Tabla 3. Apariencia y características organolépticas de los extractos blandos de propóleo comercial (EBPC)**

Número de muestra	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Aspecto											
Color	Marrón	Rojo	Marrón	Amarillo rojizo	Marrón	Marrón	Marrón	Marrón	Amarillo	Pardo	Pardo
Aroma	Resinoso aromático	Balsámico	Resinoso aromático	Balsámico	Resinoso aromático	Resinoso aromático	Resinoso aromático	Resinoso aromático	Resinoso suave	Balsámico	Resinoso aromático
Sabor	Amargo	Insípido	Amargo	Picoso	Amargo	Amargo	Amargo	Amargo	Insípido	Amargo	Amargo
Consistencia	Maleable	Rígido	Maleable	Maleable	Maleable	Muy Maleable	Maleable	Maleable	Maleable	Rígido	Rígido

\*Criterios establecidos según la NOM-003-SAG/GAN-2017, Propóleos, producción y especificaciones para su procesamiento.

\*\*Foto: Alma R. Ortiz Arredondo

Por ello se analizaron 11 muestras PCP diferentes provenientes de la República Mexicana, las cuales no fueron identificadas por marca, procesándolas por dos métodos: la obtención del extracto concentrado de propóleo comercial y manejando las muestras de una manera directa. Se obtuvieron 11 muestras de EPCP por medio de una destilación a presión reducida, esto nos permitió afirmar que cada producto contenía propóleo y concordando con algunos autores que no existe uniformidad en la elaboración de PCP mexicanos ya que la cantidad de propóleo es mínima en los productos comerciales. (Ruiz, 2015) (Vargas, 2013)

Las características organolépticas en la cual dentro de este grupo de estudio predominó un aroma resinoso, color rojo, sabor balsámico fuerte y una consistencia maleable a temperatura ambiente. Se ha reportado que en México predomina el propóleo rojo debido a su fuente botánica *Dalbergia* spp. (Sforzin, 2011).

Algunos estudios hechos en Cuba han sugerido que existe una clasificación cualitativa donde separan a los propóleos en tres grupos: Propóleos pardos (tipo I): de estos propóleos se pueden obtener extractos pardos rojizos, los cuales se caracterizan químicamente por la presencia de nemorosona; Propóleos rojos (tipo II): propóleos de color rojo y en su composición química prevalecen los isoflavonoides, fundamentalmente vestitol, medicarpina, neovestitol e isosativan; y, Propóleos amarillos (tipo III): estos han sido menos estudiados en comparación con los anteriores. No obstante, se conoce que en sus extractos, de color amarillo, predomina la existencia de compuestos alifáticos, probablemente triterpenos. (Fernández, 2008). Los diferentes orígenes geográficos pueden condicionar diferente vegetación y por tanto diferente composición química para los propóleos. Sin embargo, la existencia de tres grupos fundamentales de propóleos sugiere que las abejas prefieren determinadas especies vegetales para la elaboración del propóleos se tendría que estudiar en nuestra zona geográfica.

- ***Detección de fenoles totales***

Al observar que se desarrolló un color marrón oscuro y negro en los productos comerciales de propóleo, se demostró la presencia de fenoles totales (**Figura 12**) se muestra que los productos comerciales tienen el color ya mencionado por la prueba cualitativa en la cual los fenoles que contienen los PCP forman un complejo con Fe (III).

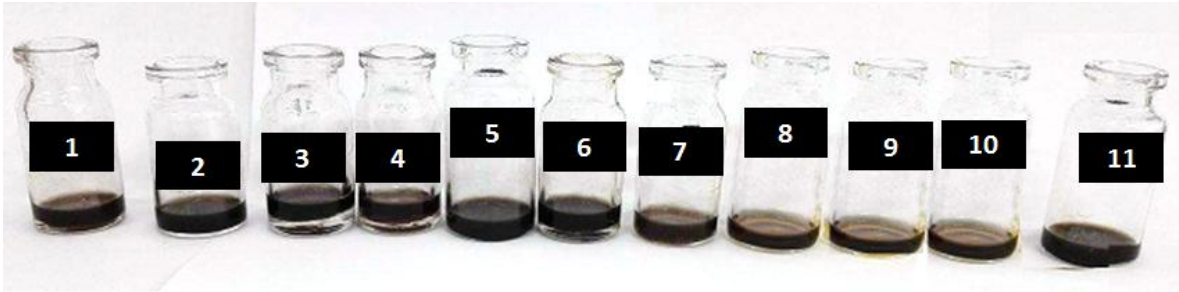


Figura 12. Prueba cualitativa de presencia de fenoles totales en productos comerciales de propóleo. Se observan tonalidades de marrón a negro.

Foto: Alma R. Ortiz Arredondo

- ***Detección de flavonoides***

Al contacto con el hidróxido de sodio (NaOH), se desarrolla un color amarillo a tonos anaranjados, que se intensifican según la cantidad de flavonoides. En la **Figura 13** los productos comerciales se observa un amarillo intenso.

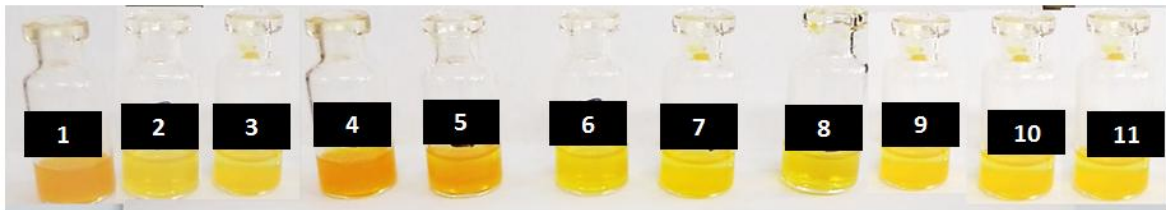


Figura 13. Prueba cualitativa de presencia de flavonoides en productos comerciales de propóleo. Se observan tonalidades de amarillo a naranja.

Foto: Alma R. Ortiz Arredondo

- ***Índice de oxidación***

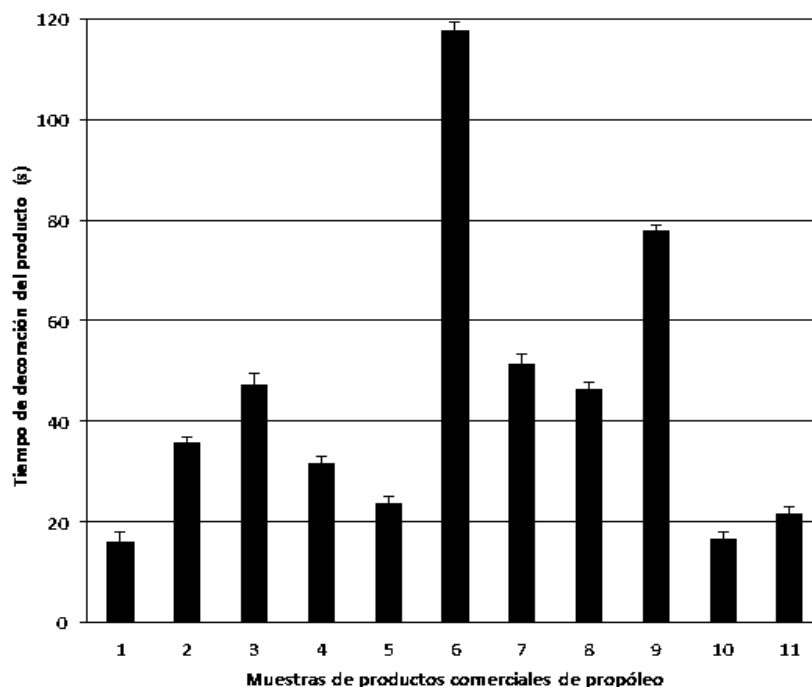
Se dice que la propiedad antioxidante es cuando se neutraliza la acción oxidante de una entidad molecular inestable de los radicales libres, sin perder su propia estabilidad electroquímica. Los radicales libres no solo dañan las membranas de las células, también llegan a destruir y mutar información de los ácidos nucleicos de las células, facilitando que se desarrollen diversos tipos de enfermedades. (Ludwig, 2013)

Autores como (Granato, 2016) mencionan que flavonoides como la catequina o la quercetina, poseen mayor actividad neutralizadora de radicales libres y que la actividad antioxidante no es proporcional a la concentración de polifenoles, ya que cuando se evalúa la capacidad de neutralizar los radicales libres no siempre es importante el contenido de polifenoles sino más bien la posición del grupo hidroxilo. (Moreno, 2014)

En la **Tabla 4** y en la **Gráfica 1** como se observó solo tres muestras (1, 10, 11), se encuentran dentro de los parámetros de la NOM-003-SAG/GAN-2017 que es un rango menor a 22 segundos. En el caso de la muestra 1, se muestra que el índice no es proporcional a cantidad de flavonoides como lo indica (Moreno, 2014)

**Tabla 4. Resultados de la determinación del índice de oxidación.**

<b>Muestra</b>	<b>Tiempo de decoración del producto (s)</b>	<b>Tiempo de decoración del producto (s)</b>	<b>Tiempo de decoración del producto (s)</b>	<b>Media</b>	<b>Desviación estándar</b>
<b>1</b>	14	16	18	16.0	2.0
<b>2</b>	36	37	35	36.0	1.0
<b>3</b>	49	45	48	47.3	2.0
<b>4</b>	32	30	33	31.6	1.5
<b>5</b>	22	24	25	23.6	1.5
<b>6</b>	118	116	119	117.6	1.5
<b>7</b>	49	53	52	51.3	2.0
<b>8</b>	46	48	45	46.3	1.5
<b>9</b>	78	77	79	78.0	1.0
<b>10</b>	18	17	15	16.6	1.5
<b>11</b>	23	20	22	21.6	1.5



**Gráfica 1.** Resultados de la determinación del índice de oxidación en productos comerciales de propóleo.

- ***Determinación de fenoles y flavonoides.***

La mezcla de ácidos fosfomolibdico y fosfotúngstico es el reactivo esencial de uno de los principales métodos para la cuantificación de compuestos polifenólicos mejor conocido como método de reactivo de Folin-Ciocalteu. Este método es el que se maneja en la NOM-003-SAG/GAN-2017 al igual que muchos autores como Moreno (2014), Ruiz (2015), Huang (2014), Stan (2012), Rodríguez (2015) entre otros, es el método más empleado el cual se mide por espectrofotometría de absorción UV-VIS con base a una reacción colorimétrica de óxido-reducción, para ello el agente oxidante que se utiliza es el reactivo de Folin-Ciocalteu.

En la **Tabla 5** y la **Gráfica 2** se muestra la determinación de fenoles y flavonoides de las muestras utilizadas. Se puede observar que el tratamiento para obtener el EPCP redujo la concentración de fenoles y flavonoides.

]

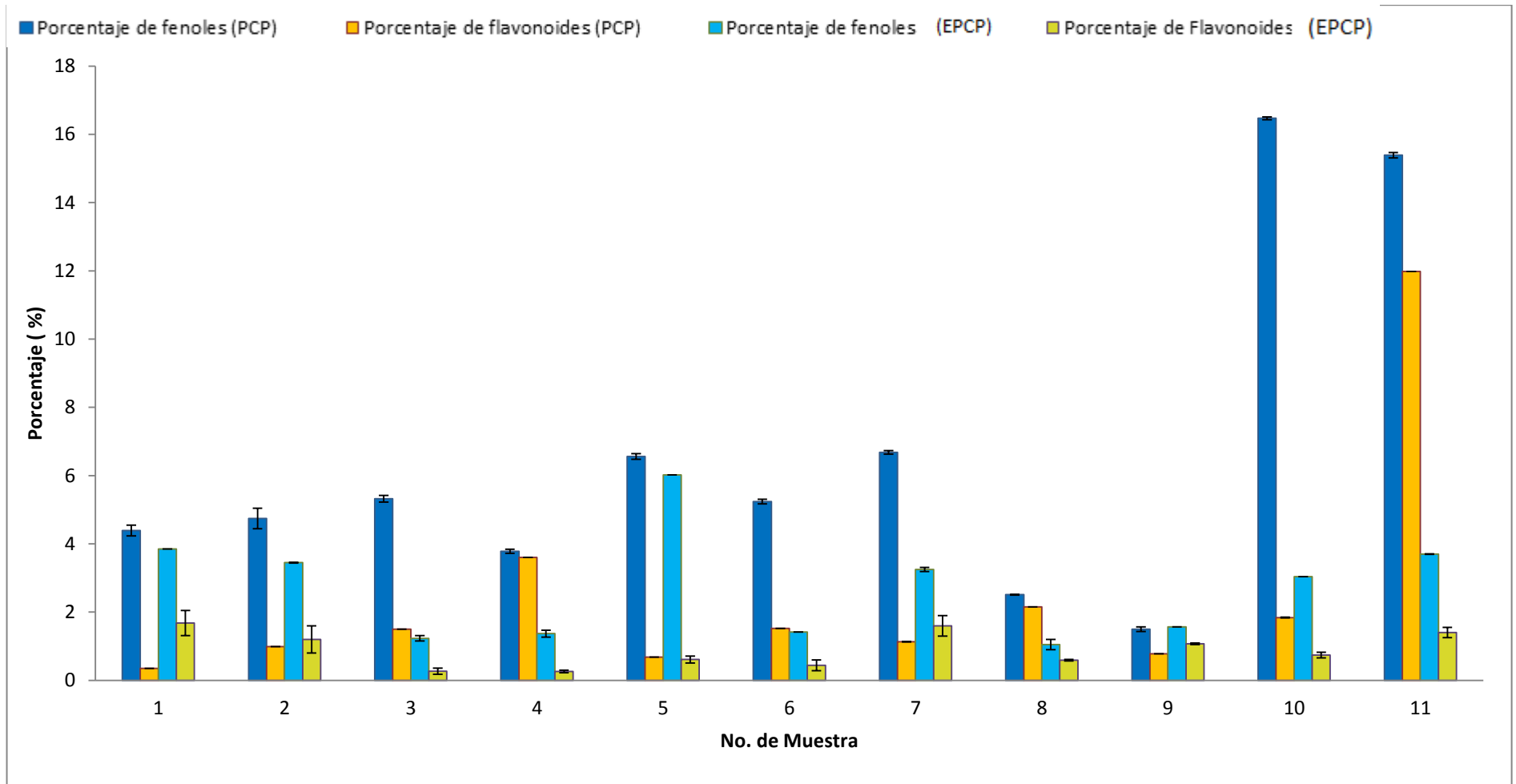


**Tabla 5. Resultados de las determinaciones de fenoles y flavonoides de los productos comerciales (PCP) y el extracto concentrado de los productos comerciales de propóleo (EPCP)**

No. de Muestra	PCP		EPCP	
	Porcentaje de Fenoles (%)	Porcentaje de Flavonoides (%)	Porcentaje de Fenoles (%)	Porcentaje de Flavonoides (%)
1	4.39 ± 0.16	0.35 ± 0	3.85 ± 0.	1.68 ± 0.37
2	4.74 ± 0.30	0.99 ± 0	3.45 ± 0.01	1.20 ± 0.40
3	5.32 ± 0.10	1.50 ± 0	1.23 ± 0.08	0.27 ± 0.09
4	3.78 ± 0.06	3.60 ± 0	1.37 ± 0.10	0.26 ± 0.04
5	6.56 ± 0.08	0.68 ± 0	6.02 ± 0	0.61 ± 0.10
6	5.24 ± 0.07	1.52 ± 0	1.42 ± 0	0.44 ± 0.16
7	6.68 ± 0.05	1.13 ± 0.01	3.25 ± 0.06	1.60 ± 0.30
8	2.51 ± 0.01	2.15 ± 0	1.05 ± 0.15	0.59 ± 0.02
9	1.50 ± 0.07	0.78 ± 0	1.57 ± 0	1.07 ± 0.02
10	16.47 ± 0.04	1.84 ± 0.01	3.04 ± 0	0.74 ± 0.08
11	15.39 ± 0.08	11.98 ± 0	3.70 ± 0.01	1.40 ± 0.15

**Los valores representan la media de las tres repeticiones ± Desviación estándar.**

**Grafica 2. Resultados de las determinaciones de fenoles y flavonoides de los productos comerciales (PCP) y el extracto blando de los productos comerciales de propóleo (EPCP)**



Dentro de los resultados se tiene una variación grande hablando de los PCP la cual va de 1% a 16% y el EPCP va de 1% a 6% en las muestras analizadas (Tabla 4). Algunos de los datos son por abajo del parámetro que marca la normatividad de México. Sin embargo existe un estudio en el cual indica que los valores bajos son debido a que el precio es alto cuando se tiene una comercialización a mayor escala. Las malas prácticas de producción de extractos limita el buen proceso utilizando sola una fase para la extracción perdiendo cierta cantidad de fenoles. (Stan, 2012)

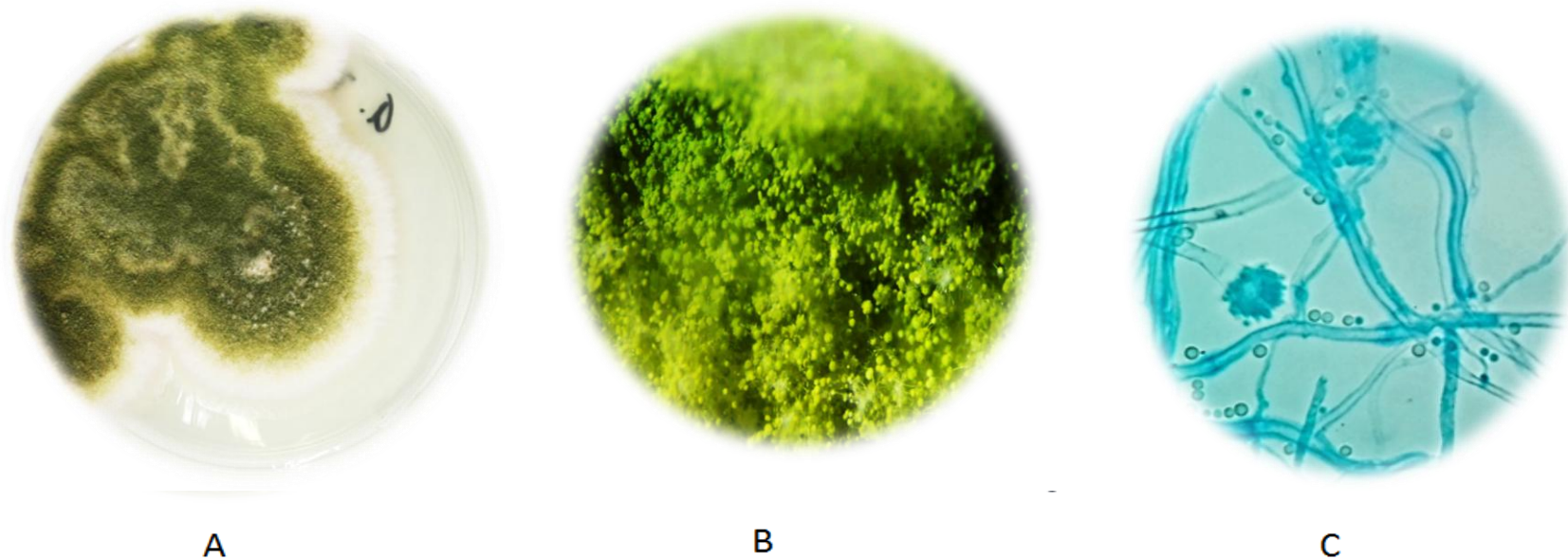
También es importante mencionar que hay una diferencia entre PCP y EPCP en la concentración de fenoles en las cuales se observa que pierde el porcentaje de los polifenoles en las muestras de EBPC. Actualmente se ha investigado que algunas moléculas no polifenólicas que pueden interaccionar con el reactivo de Folin-Ciocalteu, esto puede afectar elevando el valor real. Algunos de los principales compuestos que pueden interferir son: azúcares reductores como fructosa y glucosa, aminoácidos y ácido ascórbico. De acuerdo con Granato (2016), Lester (2012), Ludwig, (2013), Shanmugavelan (2013) posiblemente los productos comerciales contenían alguno de los compuestos que pueden interferir, sin embargo, esto no se puede conocer ya que los productos comerciales no tienen etiquetas reguladas y la información es escasa.

El contenido de compuestos fenólicos es un parámetro importante que indica la calidad, el potencial de actividad biológica siempre y cuando estos compuestos se encuentren farmacológicamente activos.

En este trabajo también se identificó las cepas a estudiar de manera macroscópica y microscópica como se muestra a continuación.

### *Aspergillus flavus*

Después de 7 días de inoculación en ADP, al reverso de la placa se observa el crecimiento abundante de aspecto algodonado con una coloración verde-amarillo. El microcultivo permitió la identificación de la especie en los aislamientos de *Aspergillus*, observando con el microscopio (**Figura 14**) un hongo hialino con microconidios redondos equinulados, presentando estructuras llamadas cabezas arpergilares compuestas por conidióforos largos y una vesícula redonda. (Bonifaz A., 2015)

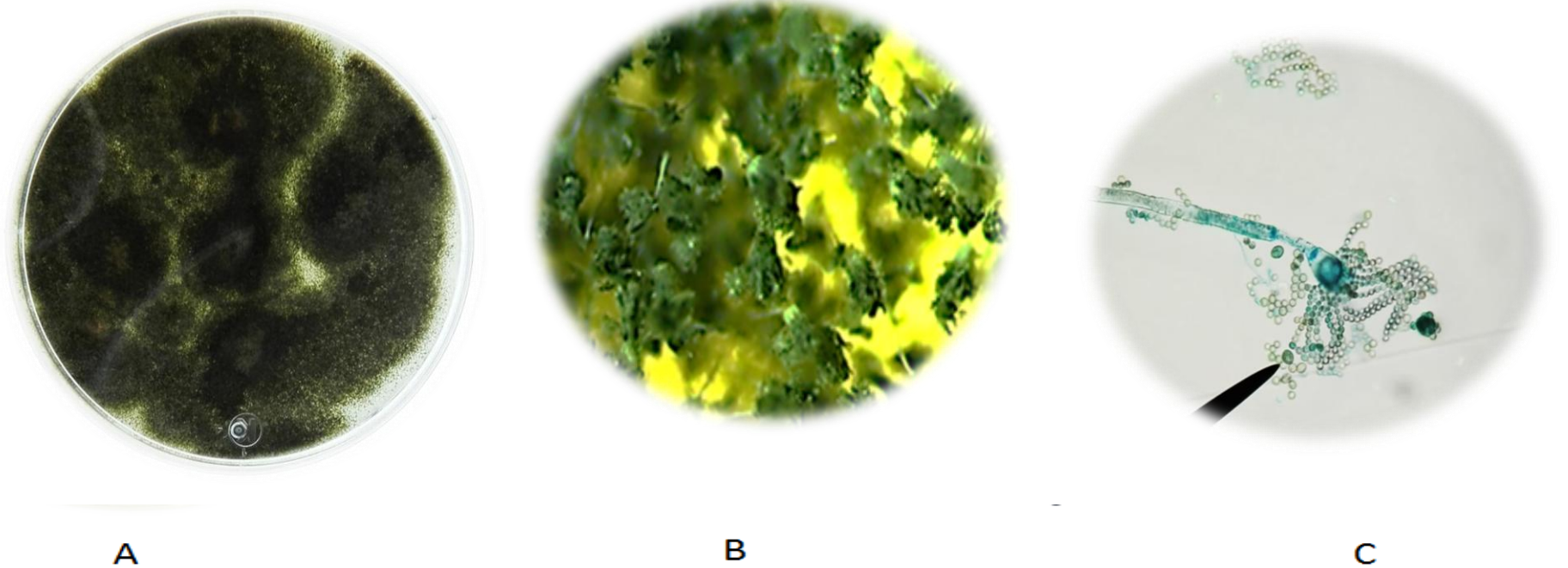


**Figura 14.** Identificación de *Aspergillus flavus*. A ) Vista macroscópica; B) Vista con microscopio estereoscópico (0.8x) y C) Vista microscópica (40x) con tinción de azul de algodón .

Foto: Alma R. Ortiz Arredondo.

***Aspergillus fumigatus***

En ADP se observó una colonia abundante de color blanco que cambia verde-azulado, textura aterciopelada y al reverso blanco. En el microscopio se observó que se trataba un hongo hialino y liso, vesícula piriforme, fialides ocupando la mitad de vesícula y conidios redondos. (Figura 15)

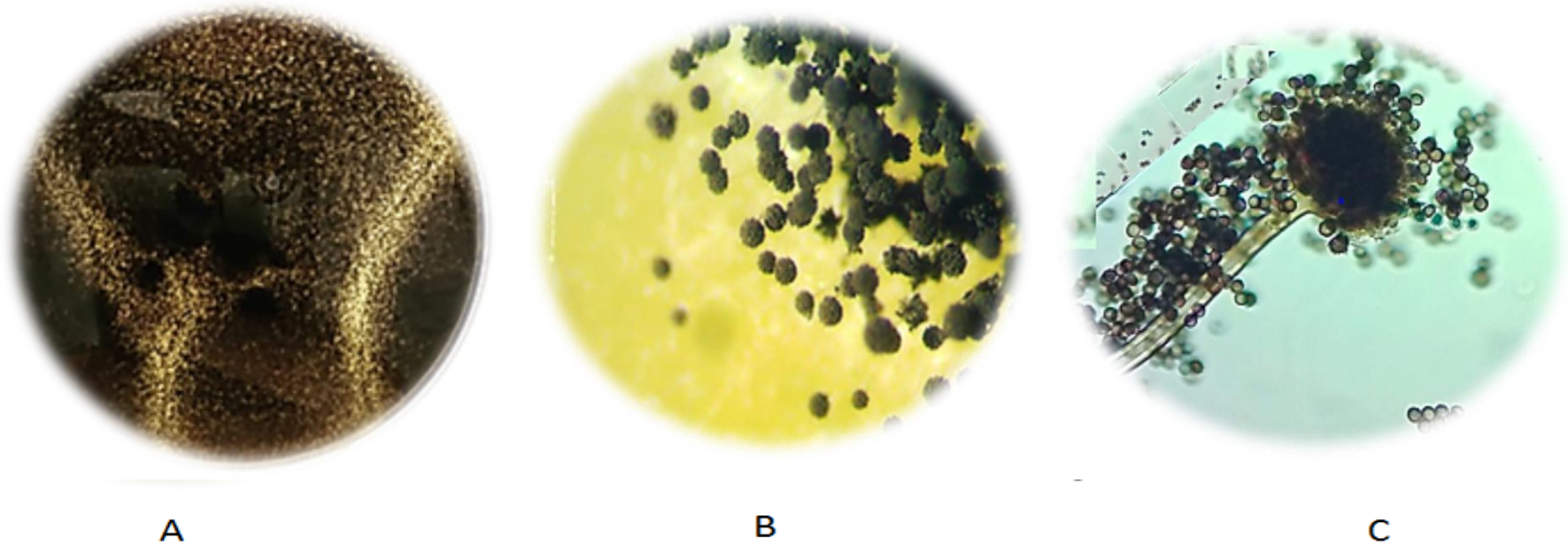


**Figura 15.** Identificación de *Aspergillus fumigatus*. A ) Vista macroscópica; B) Vista con microscopio estereoscópico (0.8x) y C) Vista microscópica (40x) con tinción de azul de algodón .

Foto: Alma R. Ortiz Arredondo.

***Aspergillus niger***

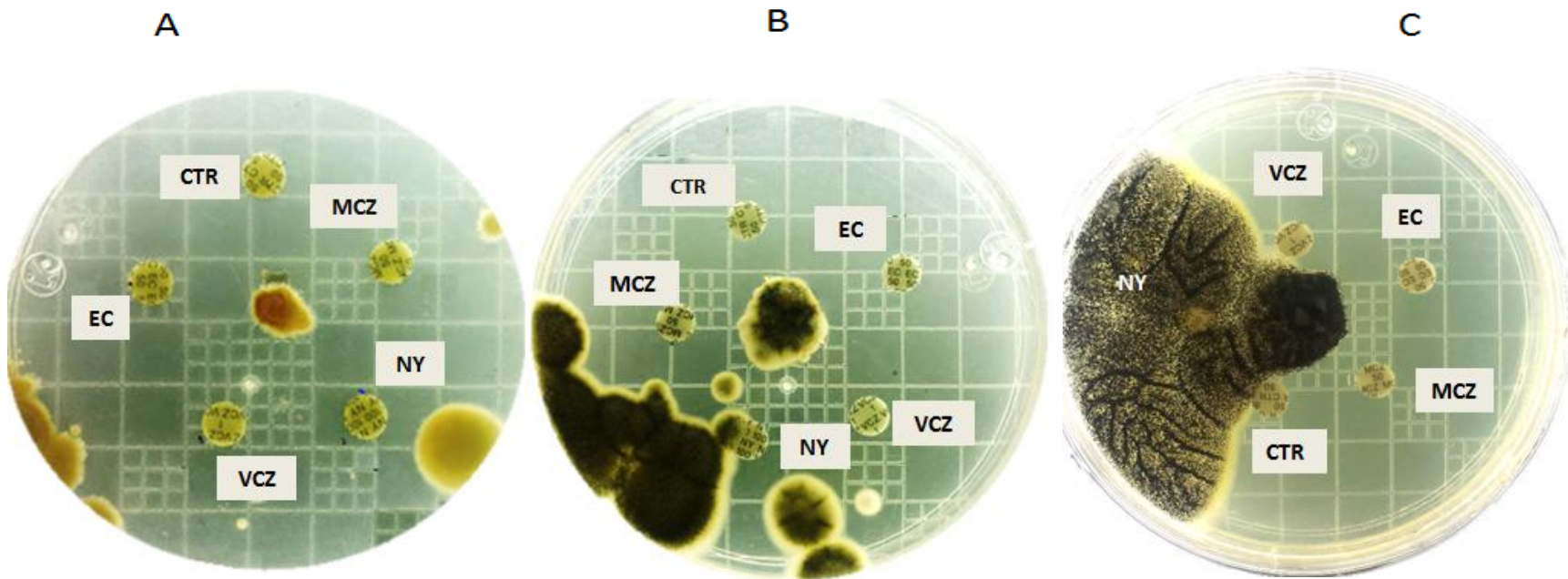
El crecimiento en ADP después de 7 días, fue abundante con coloración inicial blanca y al final las colonias maduras presentan un color negro. Al microscopio se identificó que era un hongo filamentososo hialino con cabezas conidiales radiales, lisas y de color negro. Vesícula casi esférica, métulas ocupando toda la superficie de la vesícula. Conidios globosos de color marrón. (Figura 16)



**Figura 16.** Identificación de *Aspergillus niger*. A ) Vista macroscópica; B) Vista con microscopio estereoscópico (0.8x) y C) Vista microscópica (40x) con tinción de azul de algodón .  
Foto: Alma R. Ortiz Arredondo.

### Prueba de inhibición de crecimiento radial

Se realizó la prueba para los propóleos comerciales y los extractos blandos de los propóleos comerciales por cada una de las especies de *Aspergillus*, de la misma manera se inoculo una placa con antibiótico, como se muestra en la Figura 17.



**Figura 17.** Inhibición de crecimiento radial utilizando discos comerciales. A) *A. flavus*; B) *A. fumigatus* y; C) *A. niger*.

Foto: Alma R. Ortiz Arredondo

**NOTA:** NY= Nistatina 100  $\mu\text{g}$ , EC= Econazol 50  $\mu\text{g}$ , CTR= Clotrimazol 50  $\mu\text{g}$ , VCZ= Voriconazol 1  $\mu\text{g}$  y MCZ= Miconazol 50  $\mu\text{g}$ .

**Tabla 6. Resultados de la inhibición de crecimiento de las especies utilizadas utilizando discos comerciales.**

Antifúngicos	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus niger</i>
CTR	+	+	-
EC	+	+	+
MCZ	+	+	+
NY	+	-	-
VCZ	+	+	+

\*La inhibición se denota con el signo (+), por otro lado la resistencia de las diferentes especies de utilizadas es marcada por un signo (-).

++ NOTA: NY= Nistatina 100  $\mu\text{g}$ , EC= Econazol 50  $\mu\text{g}$ , CTR= Clotrimazol 50  $\mu\text{g}$ , VCZ=Voriconazol 1  $\mu\text{g}$  y MCZ= Miconazol 50  $\mu\text{g}$

A manera de comparación se probó la sensibilidad de las diferentes especies. Entre las opciones terapéuticas la utilización de azoles debe tener en cuenta factores relacionados con el hongo y aspectos farmacocinéticos, la combinación de opciones terapéuticas en el tratamiento. La Sociedad de enfermedades Infecciosas de los Estados Unidos de América indica que el voriconazol es un triazol fungistático de buena absorción, en este trabajo se observó que es un buen fármaco para el tratamiento de *Aspergillus*. (J. A. Sugui, 2010) (Scott A W, 2010)

*Aspergillus flavus* tiene mayor inhibición contra los 5 antifúngicos, ver **Tabla 6**, en el caso de las otras dos especies no mostró inhibición contra Nistatina ya que éste es un fármaco que actúa uniéndose a los esteroides de la membrana celular de las especies sensibles de *Candida*, formando canales iónicos en las mismas, provocando cambios en la permeabilidad de la membrana y la consiguiente salida de los elementos intracelulares. (Kontoylannis D.P., 2010)

Actualmente no están completamente estudiados todos los mecanismos por los cuales el propóleo puede inhibir la presencia de ciertos patógenos; sin embargo, algunos de los componentes encontrados en los propóleos, como ácidos aromáticos y ésteres, compuestos cinámicos y flavónicos, alteran las membranas celulares, inhiben la ARN polimerasa y reducen la



motilidad bacteriana, lo cual contribuye a su acción y al sinergismo observado con algunos antibióticos. (Fernández, 2008)

Muchos autores coinciden el ácido caféico, ácido ferúlico, ácido p-cumárico, galangina y pinocembrina son flavonoides que se le atribuye la actividad antifúngica.

Dentro de las referencias consultadas, los estudios con mayor porcentaje de interés es el género de *Candida spp.* (Quintero-Mora, 2008)

**Tabla 7. Resultados de la lectura de la prueba de inhibición de crecimiento radial utilizando PCP y EPCP, sobre las diferentes especies de *Aspergillus*.**

Número de muestra	Producto comercial de propóleo. (PCP)			Extracto de propóleo comercial (EPCP)		
	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Aspergillus niger</i>
1	-	-	-	+	+	-
2	-	+	-	+	+	+
6	-	-	-	-	+	-
7	-	-	-	+	-	+
10	+	-	-	+	-	-
11	+	+	+	+	+	+
<b>Control Etanol al 70%</b>	-	-	-	-	-	-

\*La inhibición se denota con el signo (+) por otro lado la resistencia de las diferentes especies de *Aspergillus* es marcada por un signo (-).

\*\*Las muestras 3, 4, 5, 8 y 9 no presentaron ninguna inhibición por los productos.

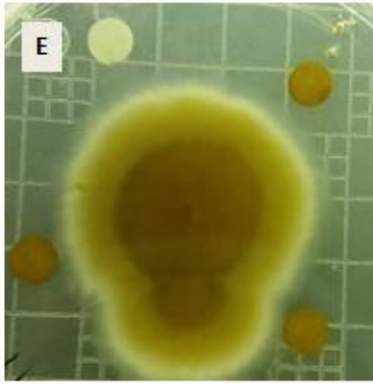
En la bibliografía consultada (Londoño et al., 2008), (Meneses, 2006), (Nedret Koc et al., 2007), (Sosa et al., 2000a), (Tripathi y Dubey, 2004) son pocos los estudios relacionados con la actividad antifúngica de propóleos 30 contra hongos fitopatógenos y alteradores de alimentos. En particular (Aly y Elewa, 2007) encontraron actividad antifúngica contra *Aspergillus versicolor* en la

conservación de quesos egipcios. Del mismo modo, Pepeljnjak y colaboradores (Pepeljnjak et al., 1982) lograron controlar el crecimiento del hongo *Aspergillus sulphureus* para examinar la biosíntesis de la ocratoxina A. Tripathi y Dubey (Tripathi y Dubey, 2004) consideraron que los propóleos son una alternativa para el control de hongos en sospecha de frutas y vegetales.

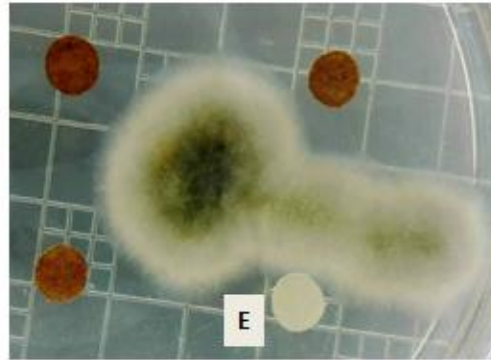
En este sentido, se ha encontrado que los propóleos inhiben el crecimiento de patógenos como *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, (Krell, 1996), (Farre et al., 2004). Adicionalmente, se han evaluado la actividad antimicótica de propóleos de diferentes regiones de Argentina, encontrando que la actividad contra los hongos fitopatógenos *Fusarium spp*, *Macropomina spp*, *Phomosis spp*, *Aspergillus niger* y *Thichoderma spp*, está relacionada con los flavonoides galangina y pinocembrina (Chaillou y Nazareno, 2009)

Dentro del trabajo se evaluó de una manera cualitativa la actividad antifúngica, observando que no todos los productos comerciales inhibieron el crecimiento, solo el propóleo 11 en PCP y EPCP se observó un efecto fungistático (**Figura 18**), también se manifestó una mayor inhibición en las muestras de EPCP. Esto podría ser como lo mencionaba Muñoz-Bernal (2017) que algunos compuestos que tuviera el producto comercial podría inhibir la presencia de los fenoles totales o en otros casos elevar el porcentaje si se tratara de frutuosa.

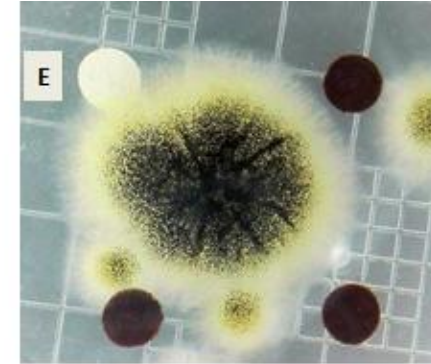
Días et al, (2007) decía que la composición y forma de manipulación de los productos naturales pueden interferir en la acción antifúngica relataron que existen diferencias de resultados frente al uso de extractos etanólicos y acuosos sobre cepas de *Candida*. Dantas, (2012) también coincidió con esto al trabajar con extractos comerciales, ellos observaron que la acción antifúngica depende de la sinergia de los compuestos, comparando esto con los resultados obtenidos se puede decir que se debe tener una estandarización de calidad que contenga los requisitos técnicos, así como los vehículos utilizados y las formas de extracción de esta forma se obtendrá un producto de calidad y eficaz.



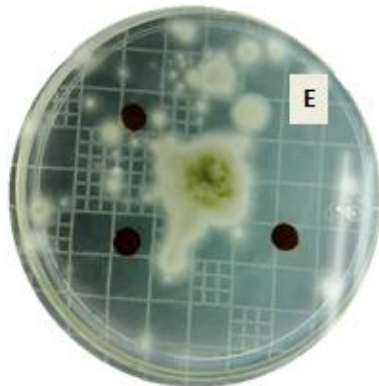
PCP 11 contra *Aspergillus flavus*.



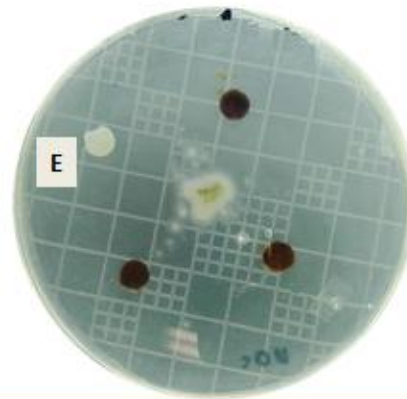
PCP 11 contra *Aspergillus fumigatus*.



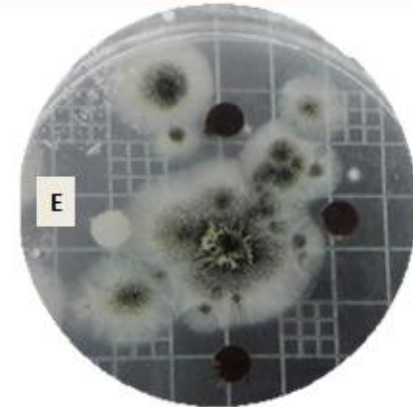
PCP 11 contra *Aspergillus niger*.



EPCP 11 contra *Aspergillus flavus*.



EPCP 11 contra *Aspergillus fumigatus*.



EPCP 11 contra *Aspergillus niger*.

**Figura 18.** Inhibición de crecimiento radial de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus* y *Aspergillus niger* utilizando discos impregnados con PCP y EPCP número 11. E) Testigo negativo con etanol al 70%.

Se observa que el producto número 11 tanto en PCP y EPCP inhibe el crecimiento en las tres especies de *Aspergillus*

Foto: Alma R. Ortiz Arredondo

## 9 Conclusiones

Se comprobó que todos los productos comerciales utilizados contenían compuestos bioactivos, sin embargo, no todos presentaron un efecto antimicótico contra las especies de *Aspergillus* utilizadas.

De los once productos comerciales de propóleo solo cinco productos no presentaron una actividad antifúngica, los productos 1, 6 y 7 solo se observó una respuesta con los extractos de los productos comerciales. El producto 10, presentó la misma respuesta contra *Aspergillus flavus*. El producto 2 presentó efecto fungistático inhibiendo a los tres tipos de especies utilizadas. En la muestra 11 tuvo la misma respuesta utilizando el producto de manera directa o utilizando el extracto teniendo una respuesta con las tres especies.

Por lo tanto se observó que los extractos secos de propóleo comerciales tuvieron una mejor actividad antifúngica que los productos comerciales de propóleo (tinturas).

Se demostró que la cantidad de fenoles y flavonoides no es proporcional al efecto de inhibición de los hongos filamentosos.

Es importante que estos productos comerciales apícolas se evalúen para que de esta forma garanticen su calidad.

## 10 Prospectivas

Se recomienda realizar un manual de procedimiento, para la elaboración de tinturas con el fin de tener una estandarización en la técnica de su elaboración y de esa forma fomentar una calidad mayor.

Se recomienda la estandarización del inóculo por medio de un conteo de esporas en la cámara de Neubauer de acuerdo al método M38-A para hongos filamentosos propuesto por el CLSI.

Se sugiere seguir con la investigación de los productos de propóleo que están en el mercado con el fin de establecer un rango de calidad a estos productos.

Se propone llevar a cabo el estudio cromatográfico de la muestra que presentó mayor actividad, con el fin de realizar investigaciones que permitan establecer los compuestos responsables de la actividad antimicótica.

Es necesario que en México se complemente los parámetros que regulen la calidad de estos productos con el fin de estandarizar, asegurar su calidad y eficacia.

## 12. Referencias

1. Abarca, L. (2000). Taxonomía e identificación de. *Rev Iberoam Micol* 2000, 17, S79-S84.
2. Agencia europea del medicamento. (EMEA). (2008). *Información de ficha técnica autorizada*. Obtenido de <https://web.archive.org/web/20061121051027/http://www.emea.europa.eu/humandocs/PDFs/EPAR/vfend/H-387-PI-es.pdf>
3. Aguirre, E. (2014). Biodiversidad de hongos en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85, 76-81.
4. Bonifaz A. (2015). *Micología Médica Básica* (5a edición ed.). México, D.F: McGraw-Hill Interamericana.
5. Bonilla, I., León de la Cruz, O., & Sánchez Rangel, D. (2018). Design, synthesis and biological evaluation of novel fungicides for the management of Fusarium DieBack disease. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 3(62), 87-98.
6. Caston Osorio J.J., R. A. (2008). Epydemiology of invasive fungal infection. *In J Antimicrob Agents*, 2(32), S103-S109.
7. Dantas de Almeida, L. I. (2012). Efeito antifúngico de tinturas de própolis e romã sobre espécies de Candida. *Revista Cubana de Estomatología*, 26(2), 99-106.
8. Dias SMD, G. R. (2007). Antifungal activity of commercial ethanolic and aqueous extracts of Brazilian. *Rev Ciênc Farm Básica*, 28(3), 259-263.
9. Espinel-Ingroff, J. T.-I.-C.-E.-F.-S. (1 de 63 de 2018). Method-Dependent Epidemiological Cutoff Values for Detection of Triazole Resistance in Candida and Aspergillus Species for the Sensititre YeastOne Colorimetric Broth and Etest Agar Diffusion Methods. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1651-1660.
10. Fernández, M. C. (2008). Análisis Cualitativo de Propóleos Cubanos por Cromatografía en Capa Delgada. *Latin American Journal of Pharmacy*, 27(3), 380-386.
11. García, L. A. (2013). Evaluación *in vitro* del efecto de propóleos con diversos orígenes sobre el desarrollo de los géneros *Aspergillus* y *Fusarium*. México: Universidad Nacional Autónoma de México.
12. Granato, D. S. (2016). Chemical perspective and criticism on selected analytical methods used to estimate the total content of phenolic compounds in food matrices. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 80, 266-279.

13. Gutierrez, E. (2011). Actividad antibacteriana y perfil químico de propóleos mexicanos sobre cepas de *Pasteurella multocida* aisladas en conejos. *Tesis de Maestría en Ciencias de la Producción y de la salud animal*. México: Universidad Nacional Autónoma de México.
14. Hernández, J. (2018). Actividad antibacteriana y sobre nematodos gastrointestinales de metabolitos secundarios vegetales: enfoque en Medicina Veterinaria. *Abanico veterinario*, 6(1), 14-27.
15. Huang, S. (2014). Recent Advances in the Chemical Composition of Propolis . *Molecules*, 19610-19632.
16. J. A. Sugui, D. C. (2010). *Neosartorya udagawae* (*Aspergillus udagawae*), an Emerging Agent of Aspergillosis: How Different Is It from *Aspergillus fumigatus*. *Journal of clinical microbiology*, 48(1), 220-228.
17. Japan Council of Propolis. (2010). Propolis voluntary food standards. *Guidebook for Export to Japan*. Japan: Japan External Trade Organization (JETRO).
18. Jean P., L. C. (2007). *Apicultura:conocimientode la abeja.Manejo de la colmena*. (4 ed.). Madrid: Mundi-Prensa.
19. Kontoylannis D.P., M. K. (2010). Prospective surveillance for invasive fungal infections in hematopoyetic stem cell transplant recipients 2001-2006. *Transplant Associated Surveillance Network ( TRANSNET)*, 50, 1091-1100.
20. La Sociedad de enfermedades Infecciosas de los Estados Unidos de América. (Febrero de 2008). Tratamiento de la Aspergilosis: Guías para la práctica clínica de la sociedad de enfermedades Infecciosas de los Estados Unidos de América (IDSA). San Antonio: GUIAS DE IDSA.
21. Lester, G. E. (2012). Comparative analysis of strawberry total phenolics via Fast Blue BB vs. Folin–Ciocalteu: Assay interference by ascorbic acid. *Journal of Food Composition and Analysis*, 27, 102-107.
22. Londoño, O. A. (2008). Estudio de la actividad antifúngica de un extracto de propóleo de la abeja *Apis mellifera* proveniente del estado de México. *Tecnología en Marcha*, 21(1), 49-55.
23. Ludwig, I. A. (2013). Effect of sugar addition (torrefacto) during roasting process on antioxidant capacity and phenolics of coffee. *LWT - Food Science and Technology*, 51, 553-559.
24. McMurry J. (2016). *Química Organica*. (C. L. Editores, Ed.) 9 Ed.

25. Moreno, E. O. (2014). Total phenolic content and antioxidant activity of pulp extracts of six tropical fruits. *Revista Colombiana de Química*, 43(3), 41-48.
26. Noriega, V. (2014). *El propóleo, otro recurso terapéutico en la práctica*. Argentina: Universidad de Cantabria.
27. Óscar A. Muñoz-Bernal, G. A.-A.-G.-G.-Z.-P. (2017). Nuevo acercamiento a la interacción del reactivo de Folin-Ciocalteu con azúcares durante la cuantificación de polifenoles totales. *REVISTA ESPECIALIZADA EN CIENCIAS QUÍMICO-BIOLÓGICAS*, 20(2), 23-28.
28. Peña, R. C. (2008). Estandarización en propóleos: antecedentes químicos y biológicos. *Ciencia e investigación agraris*, 38(1), 17-26.
29. Peñarrieta, M. (2014). Phenolic compounds in food. *Revista Boliviana de Química*, 21(2), 68-81.
30. Quintero-Mora, M. A.-O.-H.-G.-M.-Z.-M.-C.-T.-S. (2008). Effect of Mexican propolis extracts from *Apis mellifera* on *Candida albicans* in vitro growth. *rev. Iberoam. Mico*, 22-26.
31. Rodríguez, B. (2015). Perfil químico de propóleos mexicanos para su aplicación en Medicina Veterinaria. *Tesis de Maestría*. México: Universidad Nacional Autónoma de México.
32. Ruiz, U. L. (2015). Cuantificación de proteína y polifenoles totales de propóleo comercial mexicano. . *Tesis de Maestría*. México.: Universidad Nacional Autónoma de México, .
33. sabel Ruiz Campsa, M. C.-E. (2009). Antifúngicos para uso sistémico. 27(6), págs. 315-373.
34. Scott A W, A. T. (2010). *Farmacología y Terapéutica*. México, México: Manuel Moderno.
35. Secretaria de Agricultura Ganadería Desarrollo rural Pesca y Alimentación. (2010). Situación actual y perspectiva de la Apicultura en México. *Claridades Agropecuarias*, 19(9), 3-34.
36. Shanmugavelan, P. K. (2013). Evaluation of sugar content and composition in commonly consumed Korean vegetables, fruits, cereals, seed plants, and leaves by HPLC. *ELSD.Carbohydr Res*, 112-117.
37. Sifuentes Osomio J., C. L. (2012). La E pidemiology of invasive Fungal infections in Latin America. *Curr Fungal Infect Rep.*, 1(6), 23-34.
38. Stan. (2012). PROPOLIS COMMERCIAL TINCTURES – PHENOLICS AND. *Agricultura - Știință și practică*, 3(4), 81-84.
39. Thomas, J. E.-A. (2008). Tratamiento de la Aspergilosis: Guías para la práctica clínica de la Sociedad de Enfermedades Infecciosas de los Estados Unidos de América (IDSA),. *Clinical Infectious Diseases*, 46(3), 327-360.



40. Vargas, R. G. (2013). El propóleos: conservador potencial para la industria alimentaria. . *Interciencia*, 38(10), 705-711.
41. Velasquez, B. &. (2017). Actividad antimicrobiana de extractos etanólicos de propóleos obtenidos de abejas *Apis mellifera*. *Revista De Investigación Agraria Y Ambiental*, , 8(1), 185-193.

### 13. Anexos

#### ***ANEXO 1 DESTILACIÓN A PRESIÓN REDUCIDA***

Gran número de sustancias orgánicas tienen puntos de ebullición superiores a 150°C, algunas se descomponen oxidándose por debajo de los puntos de ebullición normal; otras sustancias tienen puntos de ebullición tales que su destilación no resulta conveniente, e incluso es difícil. Cuando se desea purificar o separar compuestos con las características como las anteriores, es conveniente tener en cuenta que el punto de ebullición de una sustancia depende de la presión atmosférica; así, un líquido comienza su ebullición a la temperatura en la que su presión de vapor se hace igual a la presión exterior. (McMurry J., 2016)

La destilación a presión reducida es un método de separación de disoluciones que se emplea cuando uno o más componentes de la mezcla que se desea analizar son termolábiles (aquellos compuestos que se descomponen con la temperatura), la finalidad de dicho proceso de reducción de presión es reducir la temperatura de ebullición del compuesto líquido y evaporarlo a una temperatura inferior que su temperatura normal de ebullición y temperatura de descomposición.



Montaje experimental para la destilación a presión reducida en un Rotavapor.

**ANEXO 2. DETERMINACIÓN DE FENOLES TOTALES**

Se preparó una curva de calibración a partir de una solución estándar de ácido gálico de 0.2 mg/mL empezando con una concentración de 0.000625mg/mL esta concentración se va incrementando como lo muestra la siguiente tabla

**Tabla 1. Preparación de la curva de calibración para la cuantificación de fenoles totales**

<b>Sistema</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
<b>Estándar ácido gálico (μL)</b>	31.5	62.5	125	250	500	1000
<b>Agua destilada (μL)</b>	968.5	937.5	875	750	500	--
<b>Concentración (mg /mL)</b>	0.00625	0.0125	0.025	0.05	0.1	0.2
<b>Volumen final</b>	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL

Después de tener los sistemas terminados se agregan 6 mL de agua destilada a cada sistema, después se adicionaron 500 μL de reactivo de Folin-Ciocalteu y esperar 5 minutos, se continuó la reacción adicionando 1.5 mL de la solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y aforó con agua destilada hasta un volumen de 10 mL. Se esperó 2 horas a temperatura ambiente y en un lugar con poca luz para que la reacción se llevara a cabo, en este paso se observó un cambio de color a tonalidades de azul.

Luego de la espera se determina la absorbancia en un espectrofotómetro de absorción UV-Vis a una longitud de onda de 760 nm.

Se repitió el mismo por cada muestra y cada muestra se realizó por triplicado, considerando el promedio para los resultados. En caso de que expresar los resultados en porcentaje, se utiliza la siguiente fórmula:

$$\frac{[\text{Concentración obtenida por interpolación (mg/mL)}] * 100\%}{0.05 \text{ mg/mL (concentración inicial)}}$$

**ANEXO 3. DETERMINACIÓN DE FLAVONOIDES**

El principio básico del método colorimétrico de cloruro aluminio, es que éste forma complejos estables con el grupo cetona en C-4 o bien el grupo hidroxilo en C-3 o C-5 de flavonas y flavonoles. Además, también forma complejos con los grupos hidroxilo en el anillo A o B de los flavonoides.

- **Preparación de la muestra:** Preparar una solución estándar de concentración 0.2 mg/mL de cada muestra de propóleos disueltos en etanol al 70%. Tomar una alícuota de 250 microlitros de ésta y agregar 750 microlitros de agua destilada para obtener una concentración de 0.05 mg/mL.
- **Preparación de la curva de calibración:** A partir de la solución estándar de quercetina de 1 mg/mL, tomar alícuotas correspondientes para obtener concentraciones que se muestran a continuación:

<i>Concentración (µg/mL)</i>	<i>Stock de quercetina (µL)</i>	<i>MeOH (µL)</i>
1	3	2997
2	6	2994
3	9	2991
4	12	2988
5	15	2985
6	18	2982
7	21	2979
8	24	2976
9	27	2973
10	30	2970
20	60	2940
30	90	2910
40	120	2880
50	150	2850

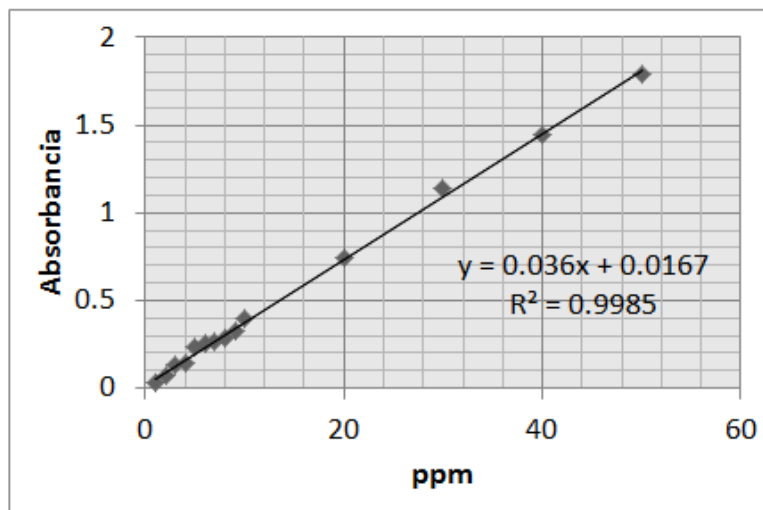
- Preparación del blanco de muestra.: Tomar 1 mililitro de la solución del EPCP (0.05 mg/mL) y agregar 1 mililitro de metanol grado reactivo.

Al tener todos los sistemas anteriores preparados, se procede de la siguiente manera:

- Adicionar a cada tubo, 1 mililitro de la solución de AlCl<sub>3</sub>, esperar 10 minutos a que se lleve a cabo la reacción y determinar la absorbancia a 415 nm por espectrofotometría de absorción UV-Vis .

- Graficar la concentración contra la absorbancia para obtener la curva patrón de quercetina.

ppm	Abs
1	0.035
2	0.068
3	0.13
4	0.143
5	0.232
6	0.251
7	0.264
8	0.288
9	0.323
10	0.393
20	0.741
30	1.14
40	1.443
50	1.795



- El contenido total de flavonoides se expresa como mg de equivalentes de quercetina (QE)/g de extracto o en porcentaje (%).