



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

Efecto antifúngico de propóleos de abejas nativas
(*Scaptotrigona mexicana* y *Tetragonisca angustula*)
sobre *Malassezia pachydermatis*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA:
DIANA BERENICE FUENTES ESQUIVEL

ASESOR: Dr. Tonatiuh Alejandro Cruz Sánchez

COASESORAS: Dra. Betsabé Rodríguez Pérez
M. en C. Nelly Tovar Betancourt

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE TITULACIÓN

DR. DAVID QUINTANAR GUERRERO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: DRA. MARÍA DEL CARMEN VALDERRAMA BRAVO
Jefa del Departamento de Titulación
de la FES Cuautitlán.



UNAM
CUAUTITLÁN
DEPARTAMENTO
DE TITULACIÓN

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.**

Efecto antifúngico de propóleos de abejas nativas (*Scaptotrigona mexicana* y *Tetragonisca angustula*) sobre *Malassezia pachydermatis*

Que presenta la pasante: **Diana Berenice Fuentes Esquivel.**

Con número de cuenta: **303168920** para obtener el título de: **Médica Veterinaria Zootecnista**

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 15 de junio de 2023.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M. en E. Susana Elvira García Vázquez	
VOCAL	Dr. Tonatiuh Alejandro Cruz Sánchez	
SECRETARIO	M.V.Z. Silviano Trejo Nuñez	
1er. SUPLENTE	M.V.Z. Liborio Carrillo Miranda	
2do. SUPLENTE	M.V.Z. Armando Ramírez Villagómez	

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

MCVB/ntm*

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

A Emi, mi amora infinita.

A Fabiola, mi hermana y mejor amiga.

A Eduardo, mi compañero de muchos años.

*Al resto de mi numerosa familia, Manuel, Nohemí,
Mónica, Yazmín, Lesly, mamá y papá.*

*A las personas que, sin saberlo, le dieron un giro a
mi vida con su extraordinario apoyo, Dr. Pedro
Guzmán y Mtra. Edna Martínez.*

*Y a quienes por su valioso tiempo y consejos
este trabajo fue posible, Dr. Tona,
Dra. Betsa, Dafne y Jozz.*

Por siempre en mi corazón...

¡Muchas gracias!

La presente tesis fue apoyada por los siguientes proyectos y se realizó en el siguiente laboratorio:

- **Proyecto UNAM PAPIIT IN223719** “Evaluación de la potencialidad antimicrobiana de propóleos de abejas sin aguijón de México”.
- **Proyecto PIAPI 2011** “Investigación del propóleo de abejas nativas (abejas sin aguijón) para su aplicación en medicina veterinaria y humana”.
- **Convenio 54271-3331-9-XI-18** entre la FES Cuautitlán e INANA, A.C.
- **Cátedra de investigación CI2237** “Potencialización de la actividad biológica de propóleos con la adición de chalconas para su aplicación en la salud animal y humana”.
- **Cátedra de investigación CI2222** “Nanopartículas de propóleos de abejas nativas provenientes de Chiapas para su aplicación en medicina veterinaria”.
- **Laboratorio de Servicios de Análisis de Propóleos (LASAP)** de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán campo 4, UNAM bajo la responsabilidad del Dr. Tonatiuh A. Cruz Sánchez.



Este trabajo se presentó en los siguientes eventos académicos:

- En el 2° Congreso de Disciplinas Microbiológicas realizado el 8 y 9 de octubre de 2020 en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Modalidad ponencia oral corta con el título “Evaluación de la actividad antimicótica de propóleos de abejas nativas (*Scaptotrigona mexicana* y *Tetragonisca angustula*) sobre *Malassezia pachydermatis* para su potencial uso en otitis canina”.

Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán
Proyecto PAPIIME-UNAM: 209219



Otorgan la presente

CONSTANCIA

A: Fuentes DB, Rodríguez B, Tovar N, Cruz AT

Por su participación en la ponencia oral corta
*Evaluación de la actividad antimicótica de propóleos de abejas nativas (*Scaptotrigona mexicana* y *Tetragonisca angustula*) sobre *Malassezia pachydermatis* para su potencial uso en otitis canina*
En el 2° Congreso de Disciplinas Microbiológicas
realizado a distancia el 8 y 9 de octubre de 2020.

“Por mi raza hablará el espíritu”
Cuautitlán Izcalli, Estado de México, octubre de 2020.



Mtro. Jorge Alfredo Cuéllar Ordaz
Director

Dra. Eva Guadalupe Lizárraga Paulín
Organizadora

Dr. Enrique Salas Téllez
Organizador



Folio: 202000010

- En el Encuentro Estudiantil de Investigación en los Productos de la Colmena realizado el 10 de abril de 2021 en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Modalidad ponencia con el título “Evaluación de la actividad antimicótica de propóleos de abejas nativas (*Scaptotrigona mexicana* y *Tetragonisca angustula*) sobre *Malassezia pachydermatis*”.



The certificate features a blue and gold decorative background with a stylized floral pattern. In the top left corner, there are logos for UNAM Cuautitlán, the Secretaría General UNAM Cuautitlán, and FESC (Educación Continua). In the top right, the text identifies the Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Secretaría General, and Departamento de Educación Continua. The main text is centered and includes the recipient's name, the reason for the recognition, a quote, and the signature of the faculty director.

UNAM
CUAUTITLÁN

Secretaría
General
UNAM
CUAUTITLÁN

EDUCACIÓN
CONTINUA
FESC

Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán
Secretaría General
Departamento de Educación Continua

Otorgan el presente

Reconocimiento

**P. M.V.Z. DIANA BERENICE FUENTES
ESQUIVEL**

a:

Por su participación como ponente en el *Encuentro Estudiantil de Investigación en los Productos de la Colmena*, con la ponencia en: *Evaluación de la actividad antimicótica de propóleos de abejas nativas (Scaptotrigona mexicana y Tetragonisca angustula) sobre Malassezia pachydermatis*, que se llevó a cabo el 10 de abril de 2021.

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Cuautitlán Izcalli, Edo. de México, abril 2021.



Mtro. Jorge Alfredo Cuéllar Ordaz
Director de la Facultad

1291348 REDEC UNAM

- En el XXVI Congreso Panamericano de ciencias Veterinarias realizado del 24 al 26 de noviembre de 2021 a través de medios digitales. Modalidad cartel con el título “Evaluación de la actividad antimicótica de propóleos de abejas nativas (*Scaptotrigona mexicana* y *Tetragonisca angustula*) sobre *Malassezia pachydermatis*”.

FedMVZ MEXICO PANVET

La Asociación Panamericana de Ciencias Veterinarias y la Federación de Colegios y Asociaciones de Médicos Veterinarios Zootecnistas de México A.C. otorgan el presente

Reconocimiento

a: **BERENICE FUENTES ESQUIVEL**

Por su participación como **PONENTE** durante el **XXVI Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias** con el tema: **EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICÓTICA DE PROPÓLEOS DE ABEJAS NATIVAS (SCAPTOTRIGONA MEXICANA Y TETRAGONISCA ANGUSTULA) SOBRE MALASSEZIA PACHYDERMATIS** presentado en **MODALIDAD CARTEL**.

2021 PANVET 2021
XXVI CONGRESO PANAMERICANO DE CIENCIAS VETERINARIAS MEXICO 2021
24 al 26 de noviembre

Macarena Vidal
DRA. MACARENA VIDAL
Presidenta PANVET

Jose Palafox
DR. JOSE PALAFOX
Presidente del Comité Organizador

Francisco Suarez
DR. FRANCISCO SUÁREZ
Presidente del Comité Científico

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS	10
ÍNDICE DE FIGURAS	11
ABREVIATURAS	12
1. RESUMEN	13
2. INTRODUCCIÓN	14
2.1. Abejas nativas sin aguijón de los géneros <i>Scaptotrigona</i> y <i>Tetragonisca</i>	15
2.2. Propóleo	16
2.2.1. Composición y propiedades químicas y físicas	19
2.2.2. Compuestos fenólicos	21
2.2.3. Flavonoides	22
2.2.4. Mecanismo de acción del propóleo ante microorganismos	22
2.2.5. Antecedentes del uso de propóleo con fines terapéuticos en medicina veterinaria	24
2.2.6. Aprovechamiento económico del propóleo	25
2.3. Hongos levaduriformes	26
2.3.1. <i>Malassezia pachydermatis</i>	28
2.3.1.1. Otitis canina	30
2.3.1.2. Tratamiento convencional contra otitis canina	31
3. JUSTIFICACIÓN	33
4. HIPÓTESIS	34
5. OBJETIVOS	34
5.1. Objetivo general	34
5.2. Objetivos particulares	34
6. DISEÑO EXPERIMENTAL	35
7. METODOLOGÍA	36
7.1. Fase I. Obtención de propóleos	36
7.1.1. Especificaciones fisicoquímicas	36
7.1.2. Elaboración de Extractos Etanólicos de Propóleo (EEP)	37
7.1.3. Determinación de compuestos fenólicos	38
7.1.4. Determinación de flavonoides	39
7.2. Fase II. Obtención de cepas de <i>M. pachydermatis</i>	39
7.2.1. Pruebas para identificación de cepas de <i>M. pachydermatis</i>	40

7.2.2. Micrometría por microscopía óptica	40
7.3. Fase III. Actividad antifúngica de los EEP	40
7.3.1. Evaluación cualitativa: método de difusión en agar	41
7.3.1.1. Preparación de sensidiscos	41
7.3.1.2. Preparación de inóculos para ensayos cualitativos y cuantitativos	41
7.3.1.3. Prueba de inhibición de crecimiento radial	42
7.3.2. Evaluación cuantitativa: método de microdilución en placa	42
7.4. Fase IV. Análisis de datos	44
8. RESULTADOS	45
8.1. Especificaciones fisicoquímicas de las muestras de propóleo	45
8.2. Elaboración de los EEP	45
8.3. Determinación de compuestos fenólicos y flavonoides	46
8.4. Pruebas para identificación de cepas de <i>M. pachydermatis</i>	47
8.5. Evaluación cualitativa de la actividad antifúngica de los EEP	48
8.6. Evaluación cuantitativa de la actividad antifúngica de los EEP	50
8.7. Determinación de concentración mínima inhibitoria y concentración mínima fungicida	51
9. DISCUSIÓN	53
9.1. Análisis de la composición los EEP	53
9.2. Análisis de la caracterización de cepas de <i>M. pachydermatis</i>	57
9.3. Análisis de la actividad antifúngica de los EEP	59
10. CONCLUSIONES	64
11. PROSPECTIVAS	65
12. ANEXOS	66
12.1. ANEXO 1. Agar Dixon modificado (ADm)	66
12.2. ANEXO 2. Sabouraud Dextrose Agar (SDA)	67
12.3. ANEXO 3. Tinción de Gram	68
12.4. ANEXO 4. Prueba de la catalasa	69
12.5. ANEXO 5. Prueba de la urea	70
12.6. ANEXO 6. Caldo Dixon	71
13. BIBLIOGRAFÍA	72

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales compuestos químicos del propóleo de abejas del género <i>Apis</i>	20
Tabla 2. Especificaciones físicas y químicas de las muestras de propóleos aplicando la NOM-003-SAG/GAN-2017	45
Tabla 3. Datos de identificación de los propóleos y rendimientos obtenidos.....	46
Tabla 4. Cuantificación de fenoles y flavonoides de las muestras de propóleos aplicando la NOM-003-SAG/GAN-2017	46
Tabla 5. Pruebas de caracterización e identificación de las cepas de <i>M. pachydermatis</i> , (+) crecimiento o reacción positiva.....	47
Tabla 6. Evaluación cualitativa de la actividad antifúngica de los EEP por medio de la presencia (+) o ausencia (-) de halos de inhibición	49
Tabla 7. Evaluación cuantitativa de la actividad antifúngica de los EEP por medio del crecimiento (+) o ausencia (-) de levaduras	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. <i>Scaptotrigona mexicana</i>	15
Fig. 2. <i>Tetragonisca angustula</i>	16
Fig. 3. Microfotografía electrónica de barrido (5,000x) que muestra el rompimiento de la pared fúngica de <i>Cryptococcus neoformans</i> después de ser tratado con extracto de propóleo.....	24
Fig. 4. Morfología de una levadura (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) en proceso de gemación, se observan sus organelos	26
Fig. 5. Componentes de la membrana y pared celular fúngica	27
Fig. 6. Morfología de <i>M. pachydermatis</i>	29
Fig. 7. Canino raza American Staffordshire terrier con otitis externa.	31
Fig. 8. Esquemización del procedimiento realizado para la microdilución en placa	43
Fig. 9. Gráfico comparativo entre el rendimiento, fenoles y flavonoides de los EEP de PS y PT	47
Fig. 10. Prueba de difusión en agar.....	48
Fig. 11. Resultado de la microdilución en placa.....	51
Fig. 12. CMI (32 mg/mL) y CMF (64 mg/mL) de PT sobre la C.2 de <i>M. pachydermatis</i> ...	52
Fig. 13. Resumen de resultados de la CMI y CMF para el EEP de PT y PS.....	52
Fig. 14. Gráfica comparativa entre la cantidad de fenoles y flavonoides obtenida de la evaluación de dos diferentes EEP de <i>Apis mellifera</i>	54
Fig. 15. Comparación de los rendimientos mínimos y máximos de los EEP del presente estudio y los reportados en la literatura	57
Fig. 16. Comparación de las dimensiones micrométricas de las levaduras de <i>M. pachydermatis</i>	58
Fig. 17. Comparación de las CMI y CMF obtenidas por distintos autores y el presente trabajo	60

ABREVIATURAS

ADm	Agar Dixon modificado
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
C.1	Cepa clínica 1 de <i>Malassezia pachydermatis</i>
C.2	Cepa clínica 2 de <i>Malassezia pachydermatis</i>
C.3	Cepa clínica 3 de <i>Malassezia pachydermatis</i>
CMF	Concentración mínima fungicida
CMI	Concentración mínima inhibitoria
EEP	Extracto(s) etanólico(s) de propóleo
PS	Propóleo de <i>Scaptotrigona mexicana</i>
PT	Propóleo de <i>Tetragonisca angustula</i>
SDA	<i>Sabouraud Dextrose Agar</i>
UV-VIS	Ultravioleta visible
µg	Microgramos
µL	Microlitros
µm	Micrómetros

1. RESUMEN

En el mundo existen distribuidas más de 20 mil especies de abejas y en México, además de las del género *Apis*, se encuentran 46 especies nativas. El propóleo es una sustancia resinosa que las abejas recolectan de varias plantas y a la que añaden otros compuestos; distintos trabajos han demostrado que el propóleo de abejas *Apis mellifera* tiene actividad antimicótica y antiinflamatoria debido a su contenido de compuestos fenólicos y flavonoides, sin embargo, no se han evaluado los propóleos de abejas nativas. *Malassezia pachydermatis* es una levadura que produce otitis canina, patología recurrente de la consulta clínica diaria y con alta recidiva si no se diagnostica adecuadamente. Se evaluó *in vitro* la actividad antimicótica de dos extractos etanólicos de propóleo, uno de *Scaptotrigona mexicana* y otro de *Tetragonisca angustula* frente a tres cepas clínicas de *Malassezia pachydermatis* y una de referencia (ATCC 14522). Se ajustó el método establecido por la NOM-003-SAG/GAN-2017 para elaborar los extractos y cuantificar los compuestos fenólicos y flavonoides; la actividad antimicótica se analizó por triplicado adaptando el método de microdilución en placa de 96 pozos. La determinación de fenoles y flavonoides para el extracto de *Scaptotrigona mexicana* fue de 4.7% y 2.5%, mientras que para el de *Tetragonisca angustula* fue de 16.2% y 6.1%, respectivamente; para ambos extractos se estableció una concentración mínima inhibitoria de 32 mg/mL y una concentración mínima fungicida de 64 mg/mL. Se demostró la actividad antifúngica de los propóleos evaluados frente a *Malassezia pachydermatis*, pero el de *Tetragonisca angustula* mostró mayor rendimiento, cantidad de compuestos fenólicos y de flavonoides. Por otra parte, se observó que el método de difusión en agar resulta inviable al evaluar la actividad biológica de estos propóleos de abejas nativas sin aguijón.

2. INTRODUCCIÓN

Las abejas pertenecen al orden Hymenoptera (phylum: Arthropoda, clase: Insecta), en donde también se encuentran las avispas, hormigas y abejorros, la peculiaridad que los distingue son sus dos pares de alas membranosas. En el mundo existen aproximadamente 20 mil especies de abejas con hábitos muy diferentes entre sí, pues las hay sociales como solitarias y en México se han descrito 46 especies nativas, es decir, distintas a las abejas europeas pertenecientes al género *Apis* y que fueron introducidas al país en tiempos coloniales (González *et al.*, 2018; Arnold *et al.*, 2018).

En México, las abejas nativas (Tribu: Meliponini) se caracterizan por no presentar aguijón y la mayoría son de hábitos solitarios, siendo pocas las que se agrupan en colonias de más de 100 mil individuos según Arnold *et al.* (2018).

Antes de la llegada de los españoles al actual territorio mexicano, en Mesoamérica los mayas criaban abejas nativas de la especie *Melipona beecheii* de la que obtenían cera, propóleo y miel, y a la que llamaban “Xunáan kaab” que quiere decir “dama real o señora abeja”, sus productos eran tan demandados que su comercio llegaba hasta el mercado de Tenochtitlán, pues además de usarse la miel como endulzante, tanto ésta como la cera y el propóleo tenían usos medicinales y religiosos. Por esta razón la abeja *Melipona beecheii* ha sido el meliponino más estudiado, sin embargo, también los nahuas cultivaron otra abeja nativa, la *Scaptotrigona mexicana* (*S. mexicana*) que llamaron “Pisilnekmej” que significa “abeja pequeña”. Hoy en día el cultivo de los meliponinos o meliponicultura sigue practicándose en diferentes estados de la República y aunque ha tenido sus altibajos ahora se observa que su producción va en aumento (Arnold *et al.*, 2018; Ramírez, 1996; Guzmán, 2018).

Además del valor ritual y comercial que representan las abejas nativas, también son valiosas por ser parte fundamental de los ecosistemas ya que llevan a cabo el 90% de la polinización de plantas nativas, además de algunos cultivos, jardines y patios (Salamanca, 2017; González *et al.*, 2018).

2.1. Abejas nativas sin aguijón de los géneros *Scaptotrigona* y *Tetragonisca*

El género *Scaptotrigona* cuenta con 24 especies que se hallan distribuidas en las zonas neotropicales desde México hasta Argentina. Su tamaño varía de 4.5 a 7 mm, su cabeza y tórax son punteados. Al igual que otros meliponinos, elaboran sus nidos dentro de troncos, pero tradicionalmente se explotan en recipientes de barro. En la entrada construyen una estructura tubular con cerumen (mezcla de cera y resinas de plantas) en forma de trompeta y en la que suelen encontrarse varias obreras defensoras que, aunque son poco agresivas, atacan a los intrusos a mordidas (Hurtado, 2015).

En México se encuentran tres especies del género *Scaptotrigona*: la *S. mexicana* (Fig. 1) de color negro (a veces con alas anaranjadas), la *S. pectoralis* y la *S. hellwegeri* de coloración anaranjada con negro. Se consideran abejas resistentes y apropiadas para la meliponicultura. En cuanto a su comportamiento tanto *S. mexicana* como *S. pectoralis* son abejas agresivas al defender su nido (del cual resguardan su entrada más de 10 abejas) llegando a morder y enredarse en el cabello del invasor, mientras que *S. hellwegeri* aunque no muerde se impone al atacante al volar en grandes grupos frente a la cara de este (Arnold *et al.*, 2018).



Fig. 1. *Scaptotrigona mexicana*. Foto tomada con microscopio estereoscópico a 15x

Las abejas del género *Tetragonisca* también se localizan desde México hasta Argentina, habitando las zonas neotropicales. De este género, la especie más estudiada es *Tetragonisca angustula* (*T. angustula*, ver Fig. 2) que presenta una coloración amarilla con negro, es pequeña (mide 4.4 - 4.7 mm), de ojos verdes y de cuerpo muy esbelto y alargado con forma de dedo. Sus nidos los elaboran en huecos de árboles, construyendo su entrada de forma tubular. Se describe como una abeja no agresiva al defender su nido, custodiado por hasta 15 abejas. Aunque en México es poco común, se encuentra de Veracruz a Chiapas y en Centroamérica es muy utilizada en la meliponicultura por su fácil adaptación a los nidos artificiales, ahí es mejor conocida como “abeja angelita” (Ayala, 1999; Arnold *et al.*, 2018).



Fig. 2. *Tetragonisca angustula* (Tomada de Alexander Wild, <https://www.alexanderwild.com/Insects/Insect-Orders/Bees-Wasps-and-Sawflies/n-2S8CZ/i-zcXqDPx>)

2.2. Propóleo

Etimológicamente el término *propóleo* procede de los vocablos griegos “pro” y “polis” que significan, “delante de” y “ciudad”, respectivamente, expresando en conjunto “delante de la ciudad” y haciendo referencia a la línea de defensa que confiere esta sustancia a la colmena (Londoño, 2010; Salamanca, 2017; Rodríguez, 2019a).

El propóleo es una sustancia resinosa que las abejas recolectan de diferentes plantas y cortezas, les añaden otros productos como polen, cera, aceites esenciales, bálsamos vegetales y secreciones salivales; variando su coloración, consistencia, olor y composición según su origen botánico y el tipo de abeja que lo produce. Las abejas lo usan como sellador hermético de la colmena para mantener la temperatura, evitar la entrada de enemigos, recubrir los cadáveres de individuos propios de la colmena (como de larvas enfermas) y los de intrusos que no pudieron arrojar al exterior, impidiendo su putrefacción y previniendo la propagación de agentes patógenos (Lozina *et al.*, 2006; Tovar *et al.*, 2015; Arnold *et al.*, 2018; Rodríguez, 2019a; Deegan *et al.*, 2019).

Desde la antigüedad diferentes culturas han utilizado el propóleo con fines medicinales como la mesopotámica, egipcia, china, hindú, griega, romana, persa, hebrea, árabe, inca y mesoamericana; de hecho, su uso aparece mencionado en el Antiguo Testamento, en escritos de Aristóteles, Hipócrates, Plinio, Dioscórides y Avicena. Sin embargo, en la edad media desaparece la fama del propóleo, para retomar notoriedad tras el renacimiento y seguir empleándose hasta la época actual (Salamanca, 2017).

En México debido a la gran variedad de especies de abejas nativas y de ecosistemas con diversa vegetación, los propóleos que se producen son muy diferentes entre sí. Identificar el origen del cual proviene el material con el que las abejas producen su propóleo es más complicado que en el caso de la miel o el polen, por lo que se ha sugerido observar el comportamiento de las abejas de cada especie y región o realizar estudios quimiotaxonómicos¹. Por esta razón hasta el momento ha sido difícil caracterizar y clasificar los propóleos de abejas nativas de México, sin embargo, en Brasil hay estudios avanzados al respecto que podrían orientar futuras investigaciones (Salamanca, 2017; Vilorio *et al.*, 2012).

En el caso del género *Apis* se ha reportado que una colmena llega a producir entre 100 y 400 gramos de propóleo al año (Rodríguez, 2015), no obstante, este dato no refleja la producción anual de propóleo de las abejas nativas de las cuales se

¹ La quimiotaxonomía se encarga de relacionar la composición de los metabolitos secundarios de las plantas a taxones vegetales.

estima una cantidad menor debido a diferentes factores, como el tamaño de las abejas, el tamaño de las poblaciones, la vida y comportamiento de las diferentes especies y las técnicas de recolección poco desarrolladas empleadas por los meliponicultores (Arnold *et al.*, 2018).

El uso del propóleo con fines curativos ha sido legado tradicionalmente entre comunidades meliponicultoras que lo utilizan como remedio para picaduras de insectos, cicatrizante de heridas, infecciones de piel, de oído, respiratorias e intestinales, inflamación de encías, caries. Cabe mencionar que además de los usos medicinales, el propóleo se aprovecha para otros fines (como protector de madera, repelente de plagas en hortalizas o en la elaboración de jabones) y que dependiendo la región el nombre que recibe es diferente, por ejemplo, en Atzalan Veracruz es conocido como *tacahuite* y en la Sierra Norte de Puebla como *takahuil* (Arnold *et al.*, 2018).

Es importante mencionar que cuando las abejas no tienen fuentes de resina cercanas a su colmena utilizan sustitutos, ya sea pintura, asfalto, aceites o pegamentos, por lo que su uso podría resultar en una amenaza para la salud de las abejas y del consumidor final (Salamanca, 2017; Buestán *et al.*, 2018).

La manera tradicional de recolectar el propóleo de *Apis mellifera* es a través de la técnica de raspado, pero se ha observado que el rendimiento es menor frente a la recolección por rejilla de plástico, además, tiene el inconveniente de atrapar mayores impurezas que deprecian el producto y de contaminarlo con residuos de materiales utilizados en el manejo de las colmenas (Paz, 2018). Por lo que se recomienda el uso de rejillas de plástico en las cuales las abejas puedan acumularlo. Posteriormente se retira la rejilla, se protege de la luz, se coloca en congelación y una vez congelado se facilita el desprendimiento del propóleo de la rejilla (Salamanca, 2017; NOM-003-SAG/GAN-2017).

Una vez extraído el propóleo de la colmena se denomina “propóleo en greña o en bruto”, después de pasar por el proceso de limpieza, se coloca en reposo con etanol, luego de filtrarse se obtiene una “tintura de propóleo” y posteriormente se elimina el etanol dejando como resultado un “extracto blando de propóleo”.

2.2.1. Composición y propiedades químicas y físicas

Estandarizar la composición química del propóleo de abejas nativas es casi imposible debido a que cada especie y colmena elabora el suyo, sin embargo, a través de estudios se han podido identificar algunos compuestos generales presentes en diferentes proporciones, siendo los más comunes los fenoles y terpenoides. Otros compuestos son los flavonoides (como la pinocembrina y el ácido cafeico), ácidos aromáticos, aldehídos aromáticos, provitamina A, vitamina B3 y vitaminas del complejo B (Arnold *et al.*, 2018).

Las propiedades dependen de varios factores como son la composición, la forma de obtención, las condiciones climáticas y el periodo en cual se extrajo de la colmena. Su densidad va de 1.110 a 1.114 kg/m³; según la temperatura a la que se encuentre será su consistencia, a menos de 4°C el propóleo es duro y quebradizo, entre los 25 y 45°C es suave, flexible y pegajoso, por encima de los 60 o 70°C se hace líquido. El color sugiere el origen botánico, el sabor y aroma se relacionan a la calidad y edad del propóleo. El brillo depende de si hay o no oxidación de la parte externa. El aroma puede ser inoloro, resinoso suave, balsámico, astringente o picante. Al ser extraído de la colmena, el propóleo no se obtiene completamente puro y puede contener impurezas como cera, restos de madera, plantas o animales, por lo que es necesario someterlo a otros tratamientos para conseguir la parte con mayor aplicación biológica (Salamanca, 2017; NOM-003-SAG/GAN-2017; Rodríguez, 2019a).

Se ha establecido que la actividad biológica atribuida al propóleo se debe a su porción resinosa, compuesta principalmente por fenoles, flavonoides, terpenos y aceites esenciales volátiles; que generalmente es insoluble en agua, pero soluble en éter o alcoholes y se funde a temperatura moderada (Salamanca, 2017; Flores, 2018; Rodríguez *et al.*, 2019b).

Salamanca (2017) refiere que se han logrado identificar más de 300 compuestos en los propóleos de diferentes partes del mundo, la mitad de ellos gracias a la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (CG/EM); en la Tabla 1 se agrupan en 10 categorías según su composición química.

Tabla 1. Principales compuestos químicos del propóleo de abejas del género *Apis*

Categoría	Composición química	Procedencia	Propiedades
Grupo 1	Ácidos alifáticos y ésteres cuyas moléculas se componen de 10 a 14 átomos de carbono	Cera	Estructural
Grupo 2	Derivados del ácido cinámico	Metabolitos secundarios de las plantas	Antifúngicas y antibacterianas
	Cafeato de prenilo	Metabolitos secundarios de las plantas	Alergenas
Grupo 3	Hidroquinonas, alcohol bencílico, alcohol fenetílico, alcohol cinámico, vainillina, α y β derivados del glicerofosfato	Metabolismo de plantas y abejas	Antimicrobianas
Grupo 4			
Grupo 5	Chalconas: moléculas derivadas de la unidad estructural 1,3-difenil-2-propen-1-ona, relacionadas a la biosíntesis de flavonoides	Inflorescencias y hojas de plantas	Antibacterianas, antifúngicas, antitumorales y antiinflamatorias
Grupo 6	Flavonoides	Metabolitos secundarios de las plantas	Cicatrizantes, antioxidantes, antiinflamatorias, antitumorales, anestésicas, antimicrobianas, antimicóticas, antivirales
Grupo 7	Hidrocarburos como monoésteres de ácidos céreos, éster de colesterol, palmitato de miricilo, oleopalmitato de miricilo y colesterilo, pentacosano, heptacosano, nonacosano y heptriacontano	Metabolismo de abejas	<i>Sin dato</i>
Grupo 8	Cetonas, terpenoides como el cimeno y limoneno	Aceites esenciales	Antimicrobianas
Grupo 9			
Grupo 10	Fenoles como el ácido ferúlico, el ácido benzoico, y el CAPE (fenetil éster del ácido cafeico)	Metabolitos secundarios de las plantas	Antibióticas, antifúngicas, anticancerígenas, antiinflamatorias, inmunomoduladoras, analgésicas y antioxidantes
Otros	Trazas de minerales, provitamina A, nicotinamida, vitaminas del complejo B, lactonas, polisacáridos, aminoácidos	Polen	Metabolismo celular

Fuente: Salamanca, 2017.

Los metabolitos secundarios son compuestos de bajo peso molecular sintetizados por las plantas como respuesta de defensa química a los daños que les ocasionan los microorganismos patógenos y las lesiones que les provocan insectos y otros animales mayores; tienen gran valor comercial debido a su valor medicinal (Rodríguez, 2015).

2.2.2. Compuestos fenólicos

Se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza y se clasifican según su origen y complejidad, variando de acuerdo con el número de carbonos en su estructura. En los propóleos son los de mayor abundancia, alcanzando hasta el 50% del peso total del extracto blando. Su presencia se puede detectar por medio de una prueba cualitativa donde ocurre un cambio en la coloración a tonalidades oscuras como verdosas, azules, violetas o marrones, en cambio si la coloración es a tonos claros, se considera que hay pocos compuestos fenólicos en la muestra (Rodríguez, 2019a).

El contenido total de fenoles se determina mediante el método de Folin-Ciocalteu, donde se lleva a cabo su oxidación por el reactivo molibdotungstato fosfórico (NOM-003-SAG/GAN-2017; Salamanca, 2017).

La NOM-003-SAG/GAN-2017 los define como compuestos aromáticos que le proporcionan al propóleo sus usos y aplicaciones biológicas, debiendo estar presentes en al menos un 5% del total del extracto blando para considerar que tiene buena capacidad terapéutica. Dentro de los compuestos fenólicos se hallan los flavonoides, el fenetil éster del ácido cafeico (CAPE, por sus siglas en inglés), el ácido ferúlico, el ácido benzoico (Gómez, 2018; Rodríguez, 2019a).

Cabe mencionar que a través de un estudio de la composición química del propóleo Rodríguez *et al.* (2019b) refieren que su actividad antifúngica se asocia al CAPE y otros compuestos fenólicos como la pinocembrina y el 2-metoxi-4-vinilfenol.

2.2.3. Flavonoides

También definidos por la NOM-003-SAG/GAN-2017 como compuestos orgánicos hidroxilados derivados de exudados vegetales.

A los flavonoides se les han atribuido varias capacidades terapéuticas como cicatrizante, antiinflamatoria, antitumoral, anestésica, antimicrobiana, antimicótica, antiviral, antiparasitaria, antioxidante, etc. (Morales, 2015; Silva *et al.*, 2016; Rodríguez *et al.*, 2019b).

Algunos grupos de flavonoides son las chalconas, flavonas, flavonoles, flavanonas, flavononoles y flavandioles. Dentro de estos grupos, los compuestos con mayores propiedades antifúngicas se encuentran el kaempferol-7,4'-dimetil-éter, ermanina, galangina, pinocembrina, pinobanksina-3-cetato y quercetina (Salamanca, 2017; Tovar, 2016; Rodríguez, 2019a).

La prueba cualitativa que identifica la presencia de flavonoides indica que debe ocurrir un cambio en la coloración a una tonalidad anaranjada y entre más intenso sea el color se considera que hay una suma importante de flavonoides. Para cumplir la NOM-003-SAG/GAN-2017 deben estar presentes en mínimo un 0.5% del propóleo para señalarlo como de buena calidad, la cantidad se determina por medio del método colorimétrico de cloruro de aluminio ($AlCl_3$).

2.2.4. Mecanismo de acción del propóleo ante microorganismos

Además de la composición del propóleo, es importante señalar que su actividad biológica depende del método y del solvente utilizado para su extracción, ya que en algunos casos el extracto acuoso ha mostrado poseer menores resultados (Flores, 2018).

El efecto antibacteriano del propóleo se debe a que éste produce el rompimiento de la pared y membrana celular de las bacterias, disminuyendo su motilidad y provocando bacteriólisis, lo que a su vez permite la reducción de su capacidad virulenta volviéndose más vulnerables al sistema inmune. Se ha observado que hay menor sensibilidad de las bacterias Gram negativas al propóleo y se ha

apuntado que posiblemente se debe a que la estructura de su pared celular es más compleja que en las Gram positivas (Rodríguez *et al.*, 2019b; Lozina *et al.*, 2010).

Para evaluar su capacidad antibacteriana se determina la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) y entre más cercanos sean estos dos parámetros, se considera al propóleo como de mayor calidad (Rodríguez, 2015; Rodríguez, 2019a).

La actividad antiviral del propóleo se ha atribuido a los flavonoides y esteroides del ácido fenólico. En algunos estudios se ha probado que el propóleo daña las proteínas de la envoltura viral desestabilizando toda la estructura del virus, de esta forma se evita su ingreso a la célula y su replicación viral (Paz, 2018).

La actividad antifúngica de los flavonoides del propóleo se debe a que estos inducen la germinación y destrucción de esporas (Salamanca, 2017). Por microscopía óptica y electrónica de barrido se ha observado que el propóleo causa daño estructural en las levaduras, inhibiendo la formación del tubo germinativo y destruyendo su membrana y pared celular (Tovar, 2016; Gómez, 2018). Hee (2002) reportó que el extracto de propóleo provocaba cambios en la estructura celular de *Cryptococcus neoformans* (Fig. 3); del mismo modo, Londoño (2010) menciona que la actividad antifúngica sobre *Cryptococcus neoformans* y *Candida albicans* se debe a que los compuestos del propóleo como el CAPE, los flavonoides y los ésteres fenólicos inducen cambios en la morfología de los hongos. De igual forma, se puede evaluar el potencial antifúngico y calidad de los propóleos al determinar la CMI y la concentración mínima fungicida (CMF).

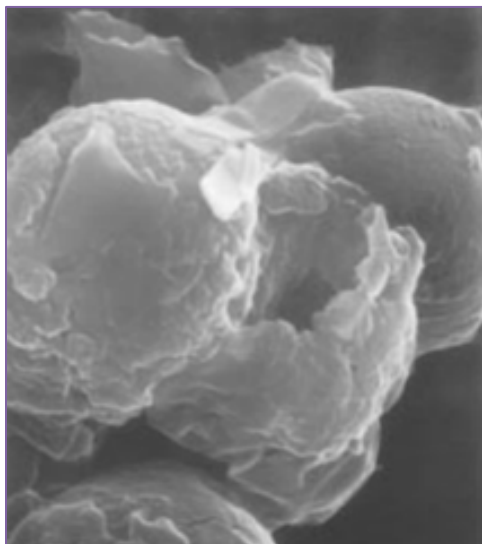


Fig. 3. Microfotografía electrónica de barrido (5,000x) que muestra el rompimiento de la pared fúngica de *Cryptococcus neoformans* después de ser tratado con extracto de propóleo (Tomada de Hee, 2002)

2.2.5. Antecedentes del uso de propóleo con fines terapéuticos en medicina veterinaria

Tovar *et al.* (2015) hacen un recuento bibliográfico de las aplicaciones del propóleo en la clínica canina y mencionan que se ha utilizado en casos de tumor venéreo transmisible (TVT), osteosarcoma canino, síndrome de Cushing, infecciones bacterianas, otitis, dermatofitosis, parasitosis, enfermedad periodontal, oftalmopatías, enfermedades hepáticas y como refuerzo del sistema inmunológico.

El propóleo también se ha aplicado en terneros para aumentar la ganancia de peso y reducir diarreas cuando son alimentados con leche. Se ha probado contra mastitis inclusive en casos en los que la infección es resistente a antibióticos. Otro uso en conejos ha sido para tratar coccidiosis y protozoos intestinales (Salamanca, 2017).

Flores *et al.* (2016) trataron a equinos que presentaban problemas de dermatomicosis con shampoo y pomadas a base de propóleos.

2.2.6. Aprovechamiento económico del propóleo

La resistencia microbiana a antibióticos y antifúngicos se presenta de manera cada vez más frecuente debido al mal uso que se hace de ellos, dentro de este contexto los propóleos pueden ser una opción terapéutica gracias a la acción antimicrobiana de algunos de sus compuestos y al posible menor costo de tratamiento (Tovar *et al.*, 2015; Flores *et al.*, 2016; Salamanca, 2017).

El uso comercial del propóleo se basa en las preparaciones de extractos líquidos que pueden ser a base de agua o alcohol, pero medicinalmente también se puede usar de forma directa (Salamanca, 2017).

En la actualidad se observa un creciente interés por el uso y aprovechamiento de los propóleos obtenidos de colmenas de abejas del género *Apis*, debido a los diversos usos terapéuticos que se le han atribuido (NOM-003-SAG/GAN-2017; Rodríguez, 2019a). No obstante, es interesante comentar que gran número de apicultores y meliponicultores se han enfocado principalmente a la producción y comercialización de miel, dejando de lado el nicho económico que el propóleo podría representar, ya sea por falta de conocimiento en las técnicas de recolección y procesamiento del producto o incluso por desconocimiento de su potencial uso terapéutico (Rodríguez, 2015).

En México la norma relativa al propóleo tiene por propósito fomentar su producción, recolección, procesamiento y comercialización (NOM-003-SAG/GAN-2017); sin embargo, es importante señalar que la norma se enfoca al propóleo producido por el género *Apis* en el que sus características y comportamiento están bien definidos. Lo anterior no ha ocurrido igual con los propóleos elaborados por abejas nativas, lo que dificulta la evaluación de la calidad de estos y a pesar del potencial medicinal que representan; así las comunidades meliponiculturas no han logrado colocarlo exitosamente en el mercado a causa de la falta de reconocimiento por la ley y la falta de estudios científicos que respalden su eficacia (Arnold *et al.*, 2018).

2.3. Hongos levaduriformes

Los hongos levaduriformes se caracterizan por ser unicelulares y reproducirse por gemación (proceso por el cual una célula madre da origen a una célula hija que al término de su desarrollo se separa dejando una cicatriz de gemación como se observa en la Fig. 4); algunas levaduras cuando son sometidas a circunstancias ambientales especiales llegan a presentar cambios fisiológicos que las hacen crecer como hongos filamentosos (Morales, 2007; Londoño, 2010).

La estructura celular de una levadura (Fig. 4) se compone de una pared y una membrana celular que contienen en su interior un citoplasma con organelos presentes en todas las células eucariotas, como mitocondria, aparato de Golgi, ribosomas, retículo endoplásmico y núcleo, pero a diferencia, también posee cuerpos lipídicos, glicógeno, vacuolas cristalinas (principalmente rellenas de ergosterol) y una red de microtúbulos que participan en la síntesis de la pared celular (Londoño, 2010).

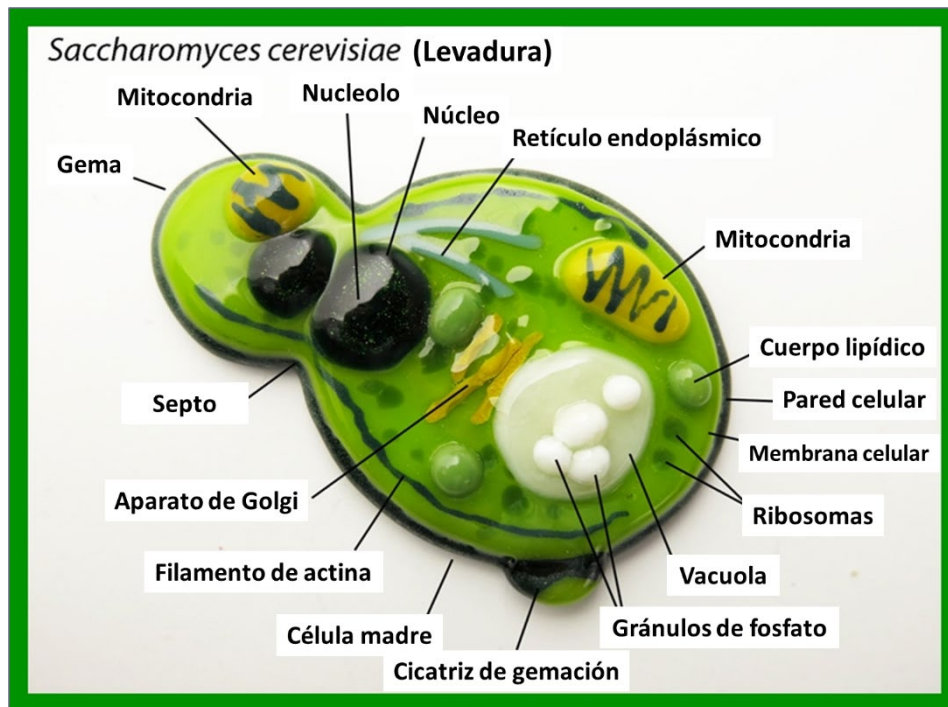


Fig. 4. Morfología de una levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) en proceso de gemación, se observan sus organelos (Tomada y modificada de la red: <https://www.visualavi.com/wp-content/uploads/2018/02/gemaci%C3%B3n-imagen.jpg>)

La membrana celular fúngica (Fig. 5), como en todas las células, es una estructura importante para la división celular, en donde gran parte de sus componentes son lípidicos (esterolatos) y de estos, el más importante es el ergosterol que participa en la función de enzimas unidas a él (Londoño, 2010).

Por su parte, la pared celular (Fig. 5) además de dar forma a la célula fúngica la separa y protege del medio externo, a la vez que le permite adherirse a su hospedero; en esta predominan los polisacáridos siendo su disposición determinada por la especie de hongo en cuestión, pero también contiene lípidos y proteínas. En la pared fúngica se puede encontrar quitina, celulosa, β -glucanos y mananos (Morales, 2007; Londoño, 2010).

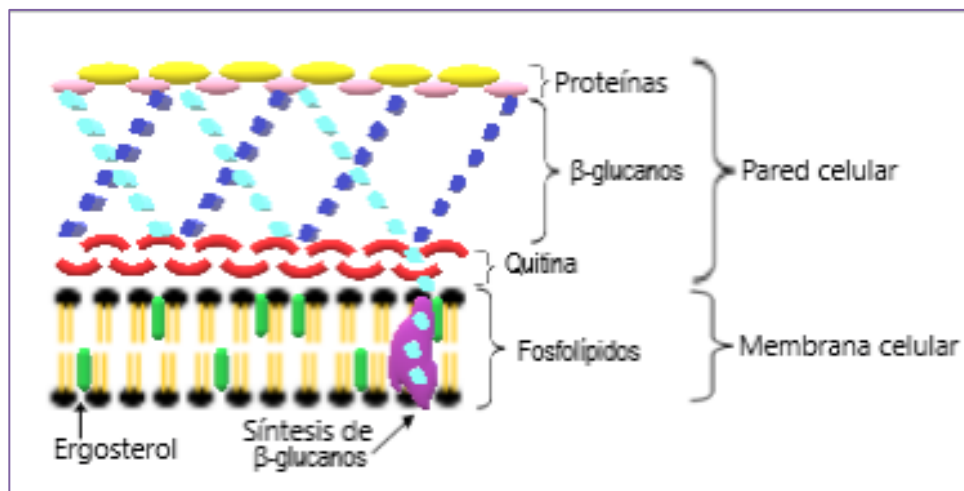


Fig. 5. Componentes de la membrana y pared celular fúngica

Debido a los componentes de la membrana y pared celular fúngica, estos son los principales blancos de los agentes antifúngicos que buscan alterar la estructura celular y así evitar su división. Entre los principales antifúngicos se hallan los azoles y las alilaminas que bloquean la síntesis de ergosterol, los polienos que rompen las membranas celulares y los lipopéptidos equinocandinas que inhiben los β -glucanos de la pared celular (Londoño, 2010).

2.3.1. *Malassezia pachydermatis*

Las levaduras del género *Malassezia* pertenecen al phylum *Basidiomycota*, se clasifican en 16 especies diferentes, aunque Flores (2018) menciona 17, según características morfológicas y de requerimientos para su crecimiento; debido a que utilizan lípidos como fuente de carbono se encuentran habitando la piel de humanos y otros mamíferos, rica en secreciones grasas (Bejar *et al.*, 2014; Rodríguez, 2014; Hurtado *et al.*, 2016; Silva, 2017; Sihelská *et al.*, 2019).

Para caracterizar a *M. pachydermatis* se evalúa su comportamiento bioquímico, su reacción enzimática a la catalasa y ureasa, crecimiento en medio Dixon y agar Dextrosa Sabouraud (SDA), la no asimilación de suplementos lipídicos como Cremophor-EL (aceite de castor) o Tween e identificación de su morfología microscópica (por micrometría) con tinción de Gram. La reacción a la catalasa puede ser positiva o negativa en *M. pachydermatis*, pero siempre es positiva a urea. Crece satisfactoriamente en agar Dixon y SDA (que no contiene suplementos lipídicos) en un rango de temperatura de incubación de 32 a 40 °C y durante 3 a 7 días. Se reporta que en algunos casos asimila a Cremophor-EL y Tween 20, pero siempre crece en Tween 40, 60 y 80. A la tinción de Gram, *M. pachydermatis* presenta una coloración violeta homogénea (Guevara *et al.*, 2007; Hurtado, 2012; Rodríguez, 2014; Silva, 2017).

Macroscópicamente forma colonias redondeadas lisas con bordes regulares y opacas de color crema aperlado (Fig. 6-A), a veces amarillento o incluso rosado, su tamaño oscila entre 4 y 5 mm, aunque algunos autores (Rodríguez, 2014) han observado colonias de 2.1 mm. Se dice que microscópicamente las células tienen forma de “suela de zapato” o “cacahuete” (Fig. 6-B), son elipsoidales con gemación monopolar en una base ancha, su tamaño varía de 2 a 2.5 µm de ancho y de 4 a 5 µm de largo. Se reproduce de manera asexual y pese a que es lipofílica no es lipodependiente (Boekhout *et al.*, 2010; Guého *et al.*, 2011; Flores, 2018).

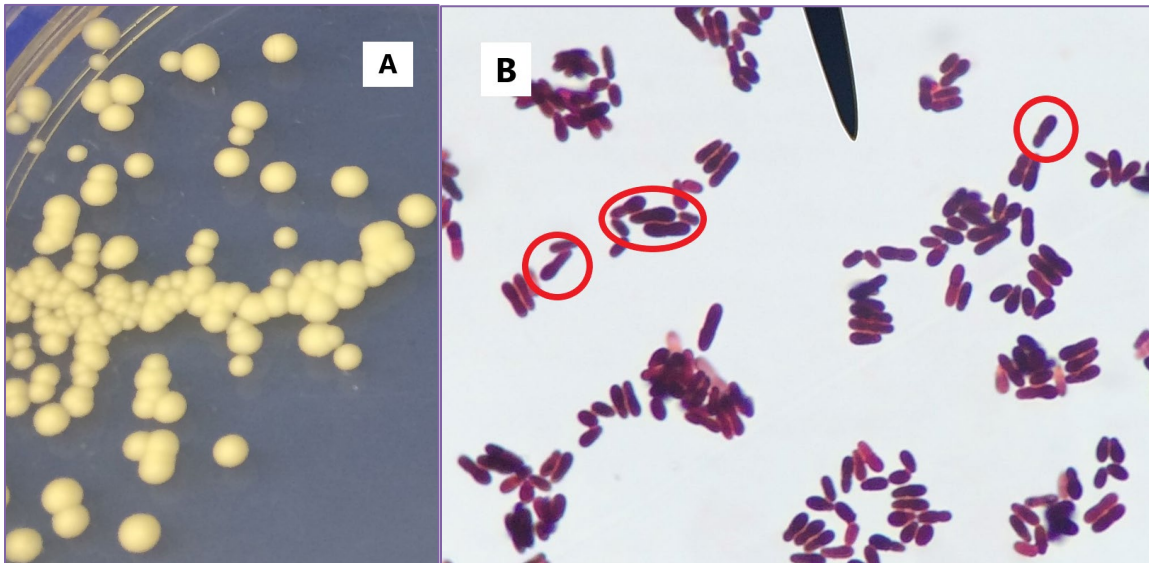


Fig. 6. Morfología de *M. pachydermatis*. (A) Vista macroscópica, se aprecia la forma redondeada, abultada y color cremoso de las colonias. (B) Vista al microscopio óptico a 100x, tinción de Gram, se observa dentro de los círculos rojos la característica forma de "suela de zapato"

M. pachydermatis es una levadura que forma parte del microbiota normal del canal auditivo externo, la cavidad oral, sacos anales y vaginales en los canideos, por lo que se considera un hongo oportunista cuando el estado inmunológico se encuentra debilitado, volviéndose patógeno y produciendo otitis por diferentes motivos, entre los que destacan el exceso de humedad o cerumen producido. Aunque no hay predilección por edad o sexo del hospedador, estos casos de otitis donde *M. pachydermatis* es el agente causal son más frecuentes en algunas razas como West Highland White Terrier, Basset Hound, Dachshound, Cocker Spaniel, Poodle, Pastor alemán y en pacientes mayores de 5 años (Gómez, 2009; Lozina *et al.*, 2010; Hurtado, 2012; Tovar *et al.*, 2015; Silva, 2017).

El mecanismo patógeno de *M. pachydermatis* ocurre debido a que la levadura propicia la desqueratinización y el rompimiento de la membrana de las células invadidas para aprovechar el material lipídico que estas contienen (Hurtado, 2012).

2.3.1.1. Otitis canina

Su presentación es multifactorial y multietiológica, para su estudio los autores la clasifican de diferente manera y algunos indican que entre las causas existen las predisponentes (factores que alteran el medio del conducto auditivo como forma de la oreja, humedad, producción de cerumen, tratamientos previos), las primarias (responsables directos de las otitis como parásitos, cuerpos extraños, trastornos de queratinización, trastornos autoinmunes, etc.), las secundarias (responsables indirectos como bacterias, hongos, cambios en la membrana timpánica, etc.) y los factores perpetuantes (bacterias y hongos que son habitantes normales de la piel de los caninos) que impiden la completa recuperación (Tovar, 2016; Paz, 2018).

Existen tres tipos de otitis, la externa, la media y la interna; y se ha reportado que más del 50% de los pacientes con otitis externa crónica desarrollan otitis media debido a que los propietarios dejan de proporcionar la atención necesaria cuando observan los primeros signos de mejoría, propiciando que la enfermedad recidive al cabo de ser suspendidos los tratamientos y generando que los patógenos desarrollen resistencia (Sánchez *et al.*, 2011; Gaviria, 2018; Tovar, 2016; Sihelská *et al.*, 2019; Deegan *et al.*, 2019).

En la práctica se ha estimado que este padecimiento representa del 10 al 20% de la práctica veterinaria diaria; de la población canina diagnosticada entre el 30 y 80% de los casos se ha asociado a *M. pachydermatis* (Flores, 2018; Paz, 2018).

La signología depende del agente causal y de la localización, pero generalmente se presenta un olor rancio que emana de la lesión, eritema, alopecia, prurito, dolor, sacudidas de cabeza, exudación seboreica de coloración marrón, descamación e inflamación severa del conducto auditivo (Fig. 7), como lesiones secundarias se incluyen excoriaciones, liquenificación e hiperpigmentación (Hernández, 2009; Lozina *et al.*, 2010; Silva, 2017; Angileri *et al.*, 2019; Sihelská *et al.*, 2019).



Fig. 7. Canino raza American Staffordshire terrier con otitis externa. Se observa secreción ceruminosa (Tomada de Silva, 2017)

Se diagnostica mediante el cuadro clínico del paciente y aunque la citología y el cultivo microbiológico serían determinantes para reconocer al agente, esto no se realiza con regularidad. Se puede tomar una muestra con ayuda de cinta adhesiva sobre las lesiones para recoger escamas de piel, posteriormente se tiñen con azul de metileno y se observan al microscopio para identificar presuntivamente al microorganismo patógeno (Hurtado *et al.*, 2016; Tovar, 2016).

2.3.1.2. Tratamiento convencional contra otitis canina

El tratamiento de elección para tratar la otitis canina causada por *M. pachydermatis* generalmente se hace con antifúngicos comerciales como ketoconazol, miconazol, clotrimazol o voriconazol, combinados con antibióticos y corticoides para evitar las infecciones bacterianas secundarias y disminuir la inflamación (Rejas, 2008; Tovar, 2016).

El mecanismo de acción de los azoles, como el ketoconazol, consiste en bloquear la formación de ergosterol (componente lipídico en la membrana fúngica) por inhibición de la 14-alfa-desmetilasa dependiente del citocromo p450 que se encuentra en el retículo endoplasmático, de esta forma se altera la membrana

fúngica, se produce un aumento de la permeabilidad, la célula se vuelve más proclive a daños y se altera la síntesis de quitina inhibiendo el crecimiento celular (Londoño, 2010; Silva, 2017; Hsieh *et al.*, 2018; Angileri *et al.*, 2019; Sihelská *et al.*, 2019; Rodríguez *et al.*, 2019c).

El ketoconazol es el antifúngico de primera elección en el tratamiento contra *M. pachydermatis*, sin embargo, Nijima *et al.* (2011) y Hsieh *et al.* (2018) han demostrado *in vitro* la resistencia de la levadura a este antimicótico, sugiriendo que esta podría ser la causa de los pacientes con recidivas. Asimismo, Angileri *et al.* (2019) reportaron un caso de resistencia *in vivo* a azoles por exposición prolongada al tratamiento, apuntando que hay cepas de *M. pachydermatis* más susceptibles que otras y que en un mismo paciente se puede encontrar más de una cepa; además, señalan que el mecanismo de resistencia de *M. pachydermatis* podría deberse a mutaciones en el gen que codifica la enzima 14-alfa-desmetilasa, por lo que la producción de ergosterol se sigue llevando a cabo. Silva (2017), Sihelská *et al.* (2019) y Deegan *et al.* (2019) son otros autores que señalan el aumento de la resistencia fúngica a los azoles.

Una alternativa a los antifúngicos para tratar la otitis canina es el uso de propóleo en pacientes con alta recidiva por sus efectos antimicóticos, antiinflamatorios y cicatrizantes, pero hasta el momento sólo se ha probado con el propóleo de *Apis* (Lozina *et al.*, 2010; Tovar, 2016; Flores, 2018; Deegan *et al.*, 2019).

3. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad se ha probado científicamente la eficacia del propóleo de *Apis mellifera* sobre levaduras causantes de otitis canina, tanto *in vitro* como *in vivo*. Aunque el ketoconazol sigue siendo el fármaco más usado para tratar esta patología debido a su mayor eficacia, se ha demostrado *in vitro* que *M. pachydermatis* puede desarrollar resistencia a este medicamento, lo que no se ha detectado que suceda con el propóleo de *Apis*. Sin embargo, no se ha ensayado el efecto antimicótico del propóleo de los meliponinos, por lo que el presente trabajo tiene por objetivo contribuir a este estudio.

Desde el México antiguo se han utilizado los productos elaborados por la abeja sin aguijón *S. mexicana*, como miel, polen y propóleo, con fines terapéuticos, y aunque recientemente varios estudios han probado la efectividad de la miel como antimicrobiano, pocos se han realizado respecto al propóleo y menos aún sobre su efecto frente a la levadura *M. pachydermatis*. En relación con *T. angustula* se sabe que es una abeja muy utilizada en la meliponicultura centroamericana, pero en la literatura existe poca información sobre experimentaciones que demuestren la eficacia medicinal de sus productos.

La realización de estudios entorno a la potencialidad antimicótica del propóleo de abejas nativas podría elevar la estima de su uso como tratamiento alternativo en la corrección de algunas patologías como la otitis canina, estimulando así su producción y aprovechamiento, repercutiendo favorablemente en el desarrollo económico de los meliponicultores.

En el país la meliponicultura es una producción de tipo tradicional por lo que el presente trabajo espera contribuir a promover la explotación del propóleo producido por las abejas nativas con fines terapéuticos.

4. HIPÓTESIS

Los propóleos de abejas nativas *S. mexicana* y *T. angustula* inhiben el crecimiento *in vitro* de *M. pachydermatis*.

5. OBJETIVOS

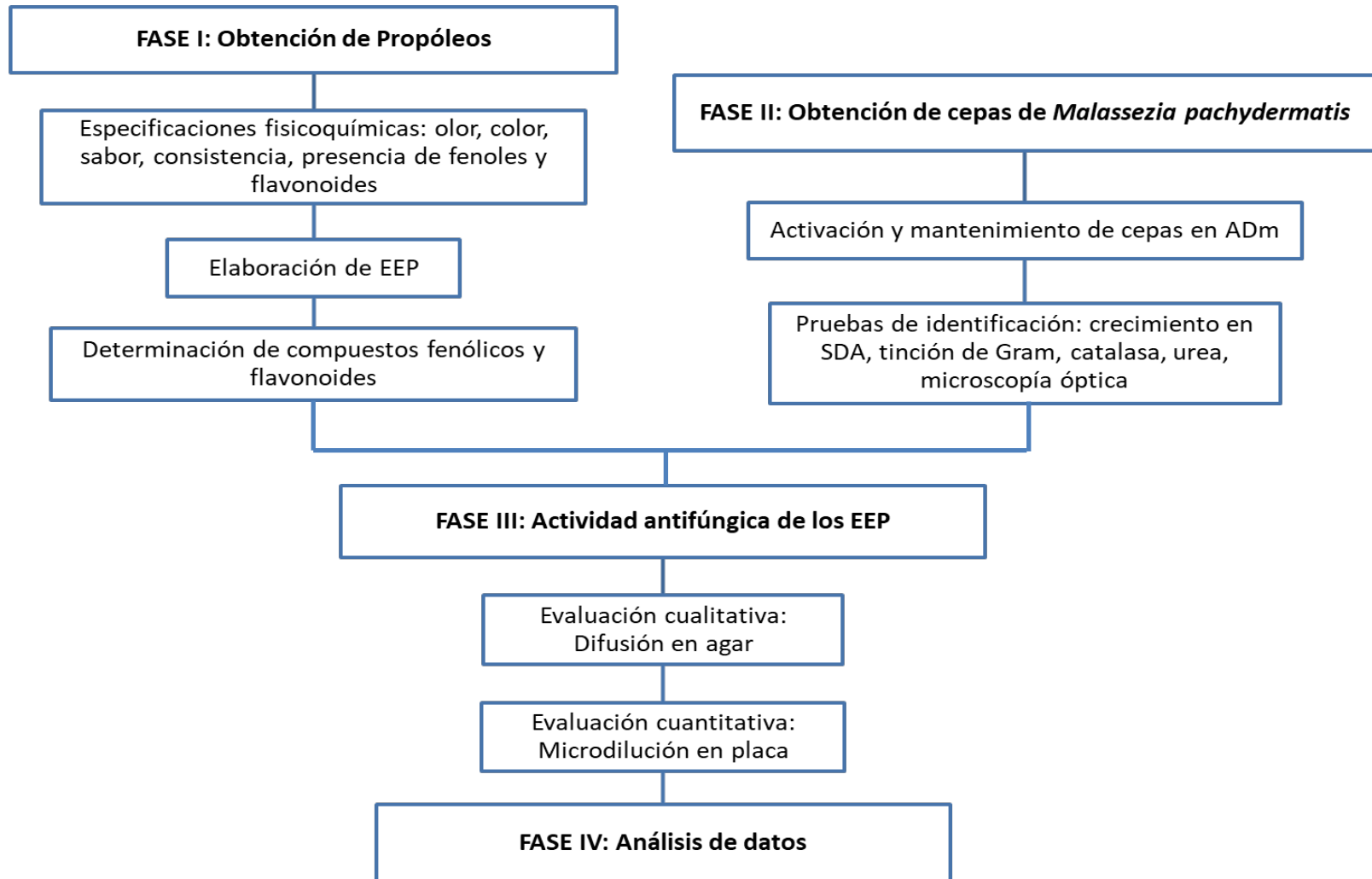
5.1. Objetivo general

Determinar si los Extractos Etanólicos de Propóleo (EEP) de abejas nativas de la especie *S. mexicana* y *T. angustula* tienen actividad antifúngica sobre cepas de *M. pachydermatis* a través de métodos cualitativos y cuantitativos.

5.2. Objetivos particulares

- Obtener muestras de propóleo en greña de abejas nativas de las especies *S. mexicana* y *T. angustula*.
- Evaluar la calidad de los propóleos obtenidos de acuerdo con la NOM-003-SAG/GAN-2017.
- Elaborar EEP a partir de los propóleos en greña obtenidos.
- Obtener y tipificar cepas de *M. pachydermatis* de aislamientos clínicos.
- Evaluar y comparar *in vitro* el efecto antimicótico que los EEP tienen en cepas de *M. pachydermatis* mediante las pruebas de difusión en agar y microdilución en placa.
- Examinar los resultados por medio de un análisis estadístico descriptivo.

6. DISEÑO EXPERIMENTAL



7. METODOLOGÍA

7.1. Fase I. Obtención de propóleos

Se obtuvo una muestra de propóleo de *S. mexicana* (PS) recolectada con malla plástica, proveniente del municipio de Yecuatla, Veracruz, con geolocalización al Norte de 19°51' y 96°46' al Oeste, altitud 432 msnm. Otra muestra de propóleo de *T. angustula* (PT) fue recolectada por raspado, procedente del municipio de Chalchihuitán, Chiapas, cuya latitud es de 16°57' al Norte, longitud de 92°37' al Oeste y altitud de 1461 msnm.

7.1.1. Especificaciones fisicoquímicas

Según la NOM-003-SAG/GAN-2017 se deben realizar cuatro pruebas físicas, determinación de color, olor, sabor y consistencia.

Para establecer el color se coloca una pequeña cantidad de propóleo en greña sobre una superficie blanca y se observa por microscopía estereoscópica, posteriormente se define como amarillo, rojo, verde, pardo o negruzco.

La determinación de olor se realiza directamente sobre la muestra de propóleo en greña, distinguiendo entre un aroma resinoso o balsámico.

En el caso del sabor, se coloca una minúscula porción de propóleo en la parte media de la lengua, describiéndolo como suave, fuerte o picante.

Para evaluar la consistencia se pone una pequeña muestra de propóleo en vidrio de reloj y se deja a temperatura ambiente para luego manipularlo con los dedos y determinar si es maleable o rígido.

La presencia de compuestos fenólicos y flavonoides se detectó mediante el procedimiento implementado por la NOM-003-SAG/GAN-2017, con algunas modificaciones en las técnicas ya que la norma está diseñada para trabajar con propóleo de abejas del género *Apis*.

Para la determinación cualitativa de fenoles se pesaron 200 mg de cada propóleo en bruto, se le añadió 1 mL de alcohol etílico absoluto (grado reactivo) y se

homogenizó la mezcla. A continuación, se le agregó 1 gota de Cloruro férrico hexahidratado al 1% (FeCl₃·6H₂O) y se observó el cambio de coloración.

Para la detección de los flavonoides se pesaron 200 mg de cada propóleo en bruto, se les agregó 1 mL de alcohol etílico absoluto (grado reactivo), se disolvió la mezcla y se le añadió 1 gota de Hidróxido de sodio al 20% (NaOH). Se observó el cambio en la coloración.

7.1.2. Elaboración de Extractos Etanólicos de Propóleo (EEP)

El procedimiento de elaboración del EEP se realizó de acuerdo con la NOM-003-SAG/GAN-2017, con ligeras variaciones por tratarse de propóleos de abeja nativa, los cuales no presentan las mismas características que los de abejas del género *Apis*.

Se pesaron por separado 30 g del propóleo en greña de *S. mexicana* y 12 g del de *T. angustula*, se maceraron en mortero y por separado se dejaron reposar 20 minutos en 50 mL de alcohol etílico absoluto (grado reactivo). Posteriormente se colocaron en un ultrasonicador durante 1 hora (en 4 ciclos de 15 minutos) para disolver el propóleo en el alcohol etílico y facilitar la separación de sus componentes. Seguidamente se pasaron por un filtro para retirar ceras y otras impurezas que no fueran propiamente propóleo. Inmediatamente después se pusieron en un rotovapor a 60 °C durante 1 hora (en 2 ciclos de 30 minutos) para retirar el alcohol etílico. Finalmente se dejaron al vacío para terminar de eliminar los residuos de alcohol etílico y obtener el extracto blando del propóleo (NOM-003-SAG/GAN-2017; Rodríguez *et al.*, 2019b).

Una vez logrados los extractos blandos se midió el rendimiento de cada propóleo a través de la siguiente fórmula (Rodríguez, 2015):

$$\% \text{ de rendimiento} = \frac{\text{Peso del extracto blando (g)}}{\text{Peso inicial de la muestra (g)}} \times 100$$

7.1.3. Determinación de compuestos fenólicos

La cuantificación de fenoles totales se realizó en concordancia a la NOM-003-SAG/GAN-2017, salvo pequeñas variaciones, a través del método de Folin-Ciocalteu y por medio de espectrofotometría de absorción UV-VIS (ultravioleta visible).

Se prepararon seis concentraciones seriadas partiendo de una solución estándar de ácido gálico de 0.2 mg/mL. De esta solución se tomaron seis alícuotas de diferentes cantidades (0.00625, 0.0125, 0.025, 0.05, 0.1 y 0.2 mg/mL), se colocaron en tubo de ensaye y se les agregó diferente volumen de agua destilada (0.99375, 0.9875, 0.975, 0.95, 0.9 y 0.8 mL, respectivamente) para así obtener un volumen total de 1 mL en cada tubo.

Posteriormente se preparó una solución estándar a partir de cada muestra de propóleo, se tomaron 0.2 mg de EEP y se disolvieron en 1 mL de alcohol etílico absoluto (grado reactivo). De la mezcla obtenida, se colocó en un tubo de ensayo 250 μ L y se le añadió 750 μ L de alcohol etílico absoluto (grado reactivo) para finalmente conseguir una concentración de 0.05 mg/mL de solución estándar de propóleo.

Consecutivamente, a las concentraciones seriadas de ácido gálico y a la solución estándar de propóleo se les adicionó 6 mL de agua destilada y 500 μ L de reactivo Folin-Ciocalteu (mezcla de ácido fosfotúngstico/fosfomolibdico hexavalente), se esperó 5 minutos a que ocurriera la reacción oxidativa, pasado el tiempo se agregaron 1.5 μ L de carbonato de sodio (Na_2CO_3) y se aforaron con agua destilada hasta obtener un volumen de 10 mL. Las soluciones se incubaron por 2 horas a temperatura ambiente protegidas de la luz y finalmente se determinó su absorbancia en un espectrofotómetro de absorción UV-VIS a 760 nm. La concentración total de fenoles en cada muestra de propóleo se obtuvo por traspolación utilizando una curva patrón de calibración de ácido gálico y fue expresada en porcentajes (%).

7.1.4. Determinación de flavonoides

De acuerdo con la NOM-003-SAG/GAN-2017 se realizó la cuantificación de flavonoides, por medio del método colorimétrico de cloruro de aluminio y de espectrofotometría de absorción UV-VIS.

De cada propóleo se preparó una muestra con 0.2 mg de extracto blando y 1 mL de alcohol etílico absoluto (grado reactivo). De esta solución se tomaron 250 μ L y se le añadieron 750 μ L de alcohol etílico absoluto (grado reactivo) para obtener una concentración de 0.05 mg/mL. Posteriormente se les agregó 1 mL de alcohol etílico.

Se preparó una curva de calibración con ocho sistemas a diferentes concentraciones de una solución estándar de quercetina dihidratada de 1 mg/mL. Se tomaron ocho alícuotas de 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20 y 40 μ g/mL. Consecutivamente se les adicionó 1 mL de tricloruro de aluminio (AlCl_3) y se dejaron reaccionar por 10 minutos.

Finalmente se determinó la absorbancia de las muestras y los sistemas en un espectrofotómetro de absorción UV-VIS a 415 nm. Se graficó la concentración de quercetina contra la absorbancia de los sistemas, obteniendo una curva patrón de calibración, se cruzó la absorbancia de las muestras en la curva para obtener el contenido total de flavonoides expresados en porcentaje (%).

7.2. Fase II. Obtención de cepas de *M. pachydermatis*

Se utilizaron tres cepas de *M. pachydermatis* obtenidas de aislamientos clínicos y una cepa de referencia ATCC 14522 que fueron proporcionadas por el Laboratorio de Servicios de Análisis de Propóleos (LASAP) de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la FES Cuautitlán, UNAM.

Para activar las cepas de *M. pachydermatis* se sembraron en Agar Dixon modificado (**ADm**; Anexo 1). Cada cepa fue sembrada en una caja diferente y se incubó durante 72 h a 33 °C. Posteriormente, se resembró en ADm y se dejó

incubar por 48 h a 33 °C para descartar la contaminación de las cepas (Ajustado de Tovar, 2016).

Para conservar las cepas, se preparó caldo Dixon (Anexo 6) en tubos Eppendorf, cada cepa se sembró en un tubo diferente y se mantuvieron a una temperatura constante de 33 °C (Tovar, 2016).

7.2.1. Pruebas para identificación de cepas de *M. pachydermatis*

Para determinar que las cepas obtenidas correspondieran a la especie *M. pachydermatis*, se realizaron las siguientes pruebas: crecimiento en Agar Dextrosa Sabouraud (**SDA**; Anexo 2) a 33 °C durante 72 h, tinción de Gram (Anexo 3), reacción de catalasa (Anexo 4) y reacción de ureasa (Anexo 5; Guevara *et al.*, 2007; Boekhout *et al.*, 2010; Hurtado, 2012; Rodríguez, 2014; Silva, 2017).

7.2.2. Micrometría por microscopía óptica

A partir de la tinción de Gram realizada a las cepas de *M. pachydermatis*, se utilizó el software Image-Pro Express® para medir 10 microorganismos de cada cepa y obtener la media de cada una para corroborar que pertenecieran a la especie *M. pachydermatis*, cuyo tamaño de levadura oscila entre los 2-2.5 µm de ancho y 4-5 µm de largo (Guého *et al.*, 2011; Boekhout *et al.*, 2010).

7.3. Fase III. Actividad antifúngica de los EEP

La capacidad de los EEP de inhibir el crecimiento de las cepas de *M. pachydermatis* se determinó por medio de una evaluación cualitativa y una cuantitativa.

7.3.1. Evaluación cualitativa: método de difusión en agar

Este procedimiento se realizó conforme lo dispone la NOM-003-SAG/GAN-2017, utilizando discos de papel filtro de 5 mm de diámetro (Whatman No. 5) previamente esterilizados.

7.3.1.1. Preparación de sensidiscos

A partir de la obtención de los extractos blandos, se elaboraron diferentes concentraciones de EEP. Se pesaron dentro de tubo Eppendorf 1280, 640, 320 y 160 mg de cada extracto blando y a cada una de estas muestras se les añadió 100 µL de alcohol etílico absoluto para obtener concentraciones de 128, 64, 32 y 16 mg en 10 µL de EEP, respectivamente. Los discos fueron impregnados con 10 µL de cada concentración.

Como control negativo (**CN**) se utilizaron discos impregnados con 10 µL de alcohol etílico; y como control positivo (**CP**) se utilizaron discos impregnados con 50 µg/10µL de ketonazol (Conazol LIOMONT 200mg).

Posteriormente, todos los sensidiscos se dejaron secar dentro de cajas de Petri en estufa a 33 °C durante 24 h.

7.3.1.2. Preparación de inóculos para ensayos cualitativos y cuantitativos

Se realizó de acuerdo con la NOM-003-SAG/GAN-2017 con algunas adaptaciones por tratarse de un microorganismo no contemplado en la misma. 48 horas previas a preparar el inóculo, las cepas de *M. pachydermatis* fueron sembradas e incubadas a 33°C en SDA y ADm para verificar ausencia de contaminación.

Se esterilizaron cuatro tubos de ensayo con 5 mL de solución salina fisiológica al 0.9%, a cada uno se le suspendió una cepa diferente de *M. pachydermatis* hasta alcanzar un nivel de turbidez igualado a una escala del tubo 0.5 del Nefelómetro de Mc Farland.

7.3.1.3. Prueba de inhibición de crecimiento radial

Se adecuó la NOM-003-SAG/GAN-2017 de acuerdo con la levadura utilizada y los medios de cultivo en donde se desarrolla favorablemente. Las tres cepas clínicas de *M. pachydermatis* se identificaron con las siglas C.1, C.2 y C.3, mientras que la de referencia como ATCC 14522. La prueba se efectuó por duplicado para confirmar resultados.

Se realizaron sembrados masivos por cada cepa en tres cajas de SDA y tres de ADm, en la primera de SDA y ADm se colocaron los cuatro sensidiscos con las diferentes concentraciones (128, 64, 32 y 16 mg) del EPP de PS, en la segunda de SDA y ADm se pusieron los cuatro sensidiscos del EPP de PT, en las cajas restantes se colocó un sensidisco con el control negativo (alcohol etílico) y otro con el positivo (ketoconazol). Se procuró dejar 2.5 cm de distancia entre cada sensidisco. Las cajas se incubaron por 72 h a 33 °C.

7.3.2. Evaluación cuantitativa: método de microdilución en placa

El ensayo se realizó modificando el procedimiento descrito por Londoño (2010) y López (2016).

Se preparó una solución stock de 64 mg/mL de cada EEP. Para lo cual, se pesaron 640 mg de PT y de PS a los que se les añadió 10 mL de alcohol etílico absoluto (grado reactivo).

Para elaborar la prueba se utilizaron placas de ELISA estériles de 96 pozos y se preparó caldo Dextrosa Sabouraud suplementado con glucosa para optimizar el crecimiento de las cepas. A cada pozo de las placas se le colocó 50 µL del medio.

Por cada cepa de *M. pachydermatis* se utilizó una placa de ELISA. Las filas A, B y C se asignaron para el EEP de PT, las D, E y F para el EEP de PS, dando como resultado la realización de una prueba por triplicado.

En la columna 1, de la fila A a la F, se colocaron 50 µL de la solución stock de cada EEP y a partir de la columna 2 se realizaron diluciones dobles seriadas, transfiriendo 50 µL de cada pozo al de la siguiente columna. De la columna 12 se

desecharon los últimos 50 µL. Finalmente se obtuvieron concentraciones de 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 y 0.0312 mg/mL.

Consecutivamente, se añadió a cada pozo (excepto a los de la fila G) 50 µL de la cepa de *M. pachydermatis* correspondiente por placa.

En la fila G se ubicó el control negativo o de esterilidad y en la fila H el control positivo. Para el control de esterilidad sólo se colocó caldo Dextrosa Sabouraud. Mientras que para el control positivo además del caldo se añadió la cepa de *M. pachydermatis*.

Se sellaron las placas con papel parafilm para evitar la evaporación del contenido y se colocaron en incubación a 36 °C durante 48 h.

En la figura 8 se esquematiza el procedimiento realizado.

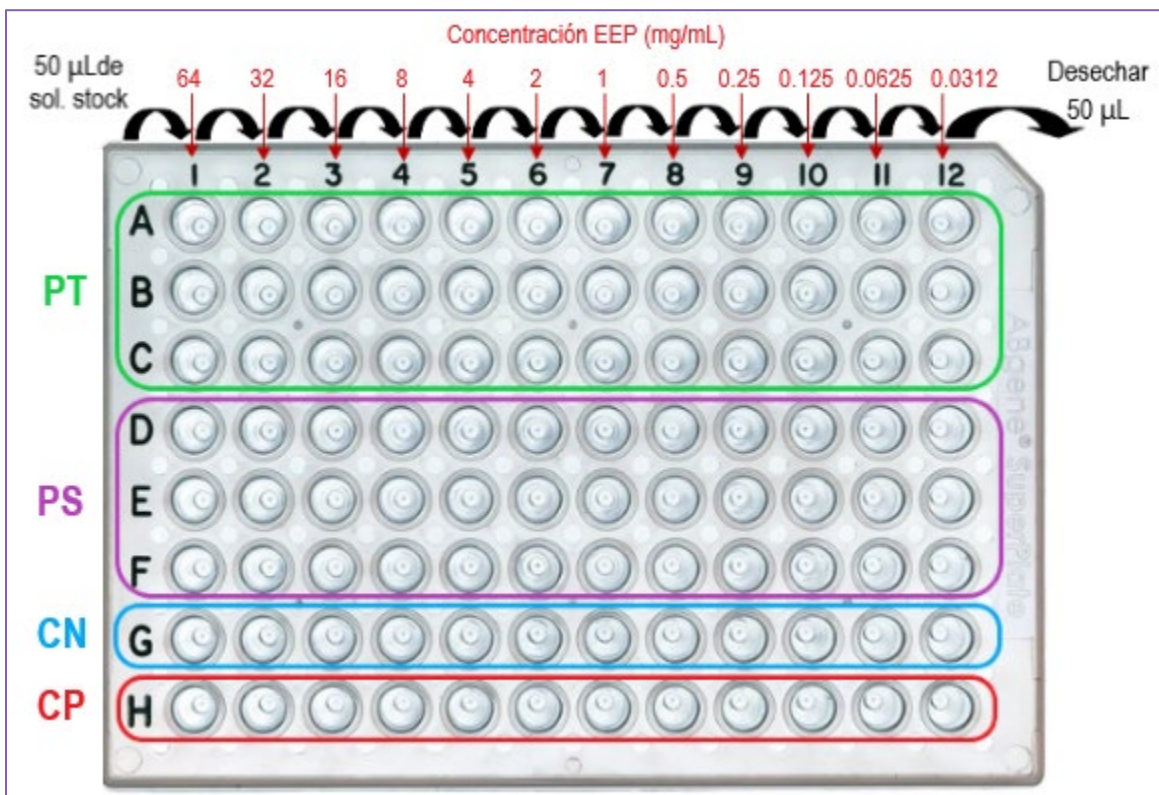


Fig. 8. Esquematización del procedimiento realizado para la microdilución en placa, donde PT se refiere al EEP de *T. angustula*, PS al EEP de *S. mexicana*, CN al control negativo y CP al control positivo

Pasado el tiempo de incubación, para medir la actividad respiratoria de las cepas se le adicionó a cada pozo 50 μ L de azul de tetrazolio al 0.08% y se incubaron todas las placas por 24 h. Por efecto de la enzima lactato deshidrogenasa, presente en las levaduras, la sal de tetrazolio se reduce a formazán que es una sal insoluble de color violeta (Hernández, 2009).

En los pozos donde hay presencia de microorganismos se observa disminución del color y la formación de un botón bien definido de color rojizo-morado al fondo de la concavidad; el último pozo donde se observa la formación del botón corresponde a la concentración mínima inhibitoria (CMI) del EEP en cuestión. Donde el desarrollo fúngico es ausente, la solución permanece clara y representa la concentración mínima fungicida (CMF) del EEP.

Para confirmar los resultados de CMI y CMF, por cada placa se tomaron 10 μ L de los pozos en cuestión y se sembraron por estría en cajas de Petri con SDA suplementado con glucosa y se dejaron incubar a 36 °C durante 72 h (modificado de Londoño, 2010).

7.4. Fase IV. Análisis de datos

Los resultados se analizaron mediante estadística descriptiva a través de herramientas gráficas.

8. RESULTADOS

8.1. Especificaciones fisicoquímicas de las muestras de propóleo

En la Tabla 2 se observan los resultados obtenidos de la evaluación de las características físicas y químicas de los propóleos evaluados.

Tabla 2. Especificaciones físicas y químicas de las muestras de propóleos aplicando la NOM-003-SAG/GAN-2017

Propóleo en greña	Olor	Color	Sabor	Consistencia
<i>S. mexicana</i>	Resinoso	Amarillo	Fuerte	Maleable
<i>T. angustula</i>	Resinoso	Rojo/Pardo	Fuerte	Maleable

Al evaluarse los propóleos en las pruebas cualitativas de fenoles y flavonoides, ambos dieron cambios en su coloración a tonos más oscuros para el caso de los fenoles, o más anaranjados en los flavonoides, lo que sugiere que ambos compuestos están presentes en las muestras de PS y PT. Sin embargo, se detectó que en el PT los colores obtenidos fueron más intensos.

8.2. Elaboración de los EEP

Debido a la capacidad productiva de cada abeja y a la técnica de recolección del propóleo, se consiguieron diferentes cantidades de propóleo en greña, por lo que su rendimiento se calculó en porcentaje (%) como se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Datos de identificación de los propóleos y rendimientos obtenidos

Identificación EEP	Especie	Procedencia	Técnica de recolección	Peso del propóleo en greña (g)	Peso EEP (g)	Rendimiento (%)
PS	<i>S. mexicana</i>	Yecuautla, Veracruz	Malla	30	9.22	30.7
PT	<i>T. angustula</i>	Chalchihuitán, Chiapas	Raspado	12	5.89	49.0

8.3. Determinación de compuestos fenólicos y flavonoides

Como se muestra en la Tabla 4, el PS no cumplió con el mínimo porcentaje de compuestos fenólicos establecido en la norma de calidad NOM-003-SAG/GAN-2017, sin embargo, sí superó el porcentaje de flavonoides totales requerido en la misma norma. Por su parte, el PT sobrepasó ambos parámetros establecidos.

Tabla 4. Cuantificación de fenoles y flavonoides de las muestras de propóleos aplicando la NOM-003-SAG/GAN-2017

EEP	% de compuestos fenólicos	% de flavonoides
PS	4.7	2.58
PT	16.2	6.1
Parámetros establecidos por la NOM	> 5	> 0.5

En el gráfico de la Figura 9 se puede apreciar que el EEP de PS tuvo un menor rendimiento, menor cantidad de compuestos fenólicos y flavonoides respecto al EEP de PT. Sin embargo, en el PS el porcentaje de flavonoides representa más de la mitad de los compuestos fenólicos totales mientras que, en el PT los flavonoides constituyen menos de una tercera parte de los fenoles.

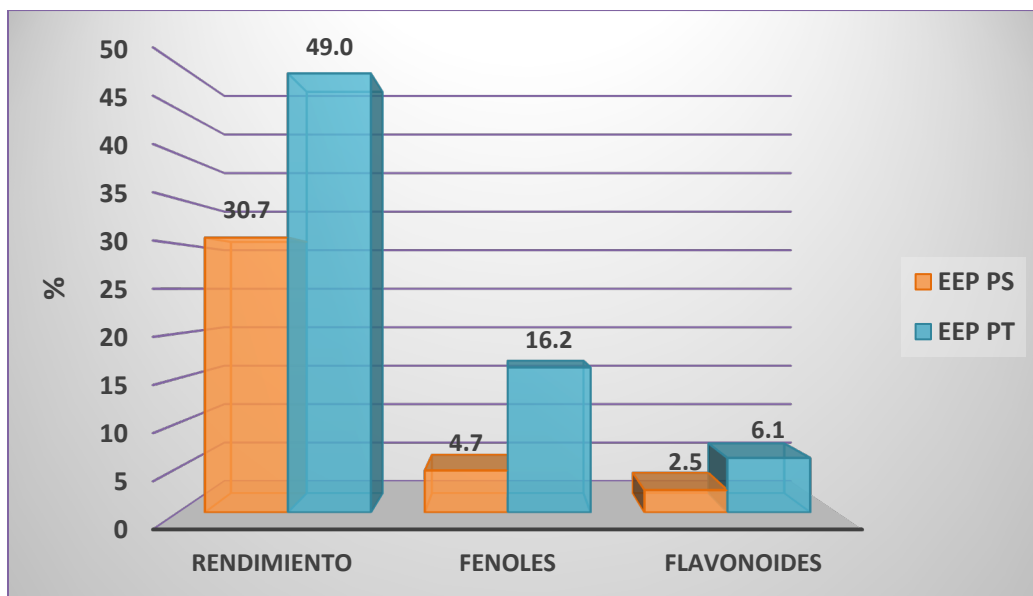


Fig. 9. Gráfico comparativo entre el rendimiento, fenoles y flavonoides de los EEP de PS y PT

8.4. Pruebas para identificación de cepas de *M. pachydermatis*

En la Tabla 5 se muestra que las cuatro cepas crecieron en SDA a 33°C durante 72 h, el tamaño promedio de las levaduras de cada cepa e igualmente se observan los resultados positivos para todas las cepas en las pruebas de catalasa y urea.

Tabla 5. Pruebas de caracterización e identificación de las cepas de *M. pachydermatis*, (+) crecimiento o reacción positiva

Cepa	Procedencia	SDA (33° C - 72 h)	Tamaño \bar{x} (Tinción de Gram)	Prueba de catalasa	Prueba de urea
ATCC 14522	LASAP - FESC, UNAM	+	2.1 x 4.1 μm	+	+
C.1	Clínica veterinaria particular, Edo. Méx.	+	2.1 x 4.6 μm	+	+
C.2	Clínica veterinaria particular, Edo. Méx.	+	2.0 x 5.2 μm	+	+
C.3	Clínica veterinaria particular, Edo. Méx.	+	2.2 x 4.9 μm	+	+

8.5. Evaluación cualitativa de la actividad antifúngica de los EEP

Se ejemplifica con la Figura 10 (A) la ausencia de halos de inhibición alrededor de los discos impregnados a diferentes concentraciones con EEP de PS sobre la C.1 sembrada en SDA. Mientras que en la Fig. 10 (B) se observa el halo de inhibición producido por efecto del ketoconazol impregnado en el disco del CP.

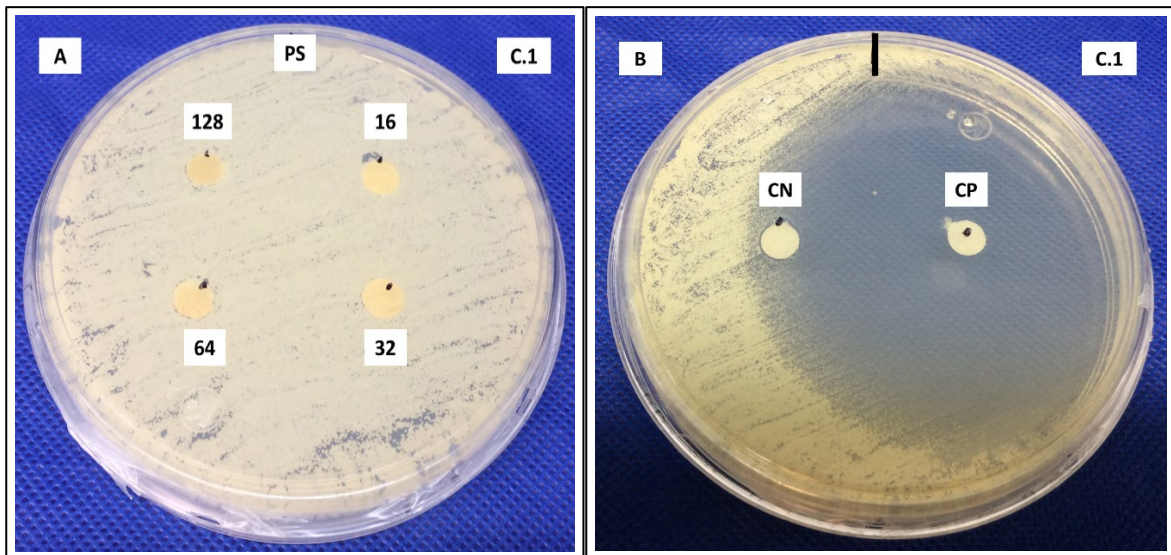


Fig. 10. Prueba de difusión en agar. **1C.1** sembrada en SDA. (A) Discos impregnados a **16, 32, 64** y **128** mg/mL de EEP de PS. (B) **CN** impregnado con alcohol etílico y **CP** impregnado con ketoconazol.

Los resultados obtenidos en la prueba de difusión en agar se resumen en la Tabla 6 en donde se señala que hubo crecimiento fúngico alrededor de los discos impregnados a diferentes concentraciones de ambos EEP colocados en los dos medios de cultivo, en el caso del control positivo se observó presencia de halos de inhibición. Se detectó que, debido a la consistencia de los EEP, estos quedaban concentrados en los discos y no difundían su actividad, por lo que se procedió a probarlos a través de técnica de microdilución en placa.

Tabla 6. Evaluación cualitativa de la actividad antifúngica de los EEP por medio de la presencia (+) o ausencia (-) de halos de inhibición

Cepa	EEP	PS (mg/mL)				PT (mg/mL)				Controles	
		128	64	32	16	128	64	32	16	Negativo	Positivo
ATCC 14522	SDA-1	-	-	-	-						
	SDA-2					-	-	-	-		
	SDA-3									-	+
	ADm-1	-	-	-	-						
	ADm-2					-	-	-	-		
	ADm-3									-	+
C.1	SDA-1	-	-	-	-						
	SDA-2					-	-	-	-		
	SDA-3									-	+
	ADm-1	-	-	-	-						
	ADm-2					-	-	-	-		
	ADm-3									-	+
C.2	SDA-1	-	-	-	-						
	SDA-2					-	-	-	-		
	SDA-3									-	+
	ADm-1	-	-	-	-						
	ADm-2					-	-	-	-		
	ADm-3									-	+
C.3	SDA-1	-	-	-	-						
	SDA-2					-	-	-	-		
	SDA-3									-	+
	ADm-1	-	-	-	-						
	ADm-2					-	-	-	-		
	ADm-3									-	+

8.6. Evaluación cuantitativa de la actividad antifúngica de los EEP

Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 7 donde se aprecia que difirieron a los arrojados por el método de difusión en agar, ya que se encontró que todas las cepas de *M. pachydermatis* fueron susceptibles a ambos EEP a concentración de 64 mg/mL.

Tabla 7. Evaluación cuantitativa de la actividad antifúngica de los EEP por medio del crecimiento (+) o ausencia (-) de levaduras

Cepa	EEP	mg/mL												Control de Esterilidad	Control Positivo
		64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25	0.125	0.0625	0.0312		
ATCC 14522	PS	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
	PT	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
C. 1	PS	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
	PT	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
C.2	PS	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
	PT	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
C.3	PS	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
	PT	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+

En la Figura 11 se ejemplifica la evaluación de la actividad antifúngica de PS y PT a través del método de microdilución en placa aplicado en la cepa ATCC 14522, en donde se determinó que la CMI fue de 32 mg/mL, mientras que la CMF fue de 64 mg/mL. Es importante señalar que derivado del tiempo de incubación de *M. pachydermatis* y la capacidad de los pozos de la placa de ELISA, parte del medio se desecó en donde la concentración de los EEP fue más alta, por lo que la formación y ausencia de botones no puede apreciarse con claridad en la imagen,

sin embargo, la determinación de la CMI y CMF de todas las placas sembradas en SDA apoyan los resultados que se señalan.

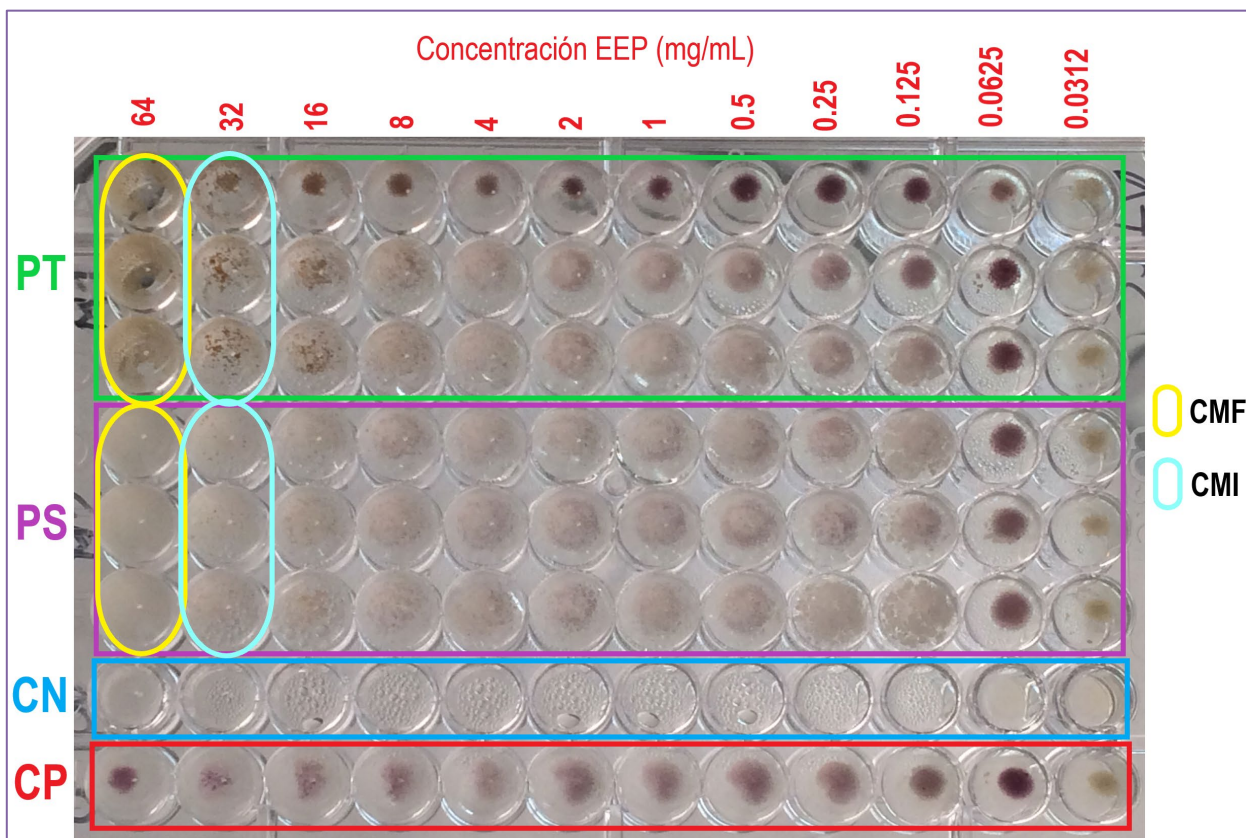


Fig. 11. Resultado de la microdilución en placa, donde se observa la **CMI** (32 mg/mL) y **CMF** (64 mg/mL) de PT y PS sobre la cepa ATCC 14522 de *M. pachydermatis*

8.7. Determinación de concentración mínima inhibitoria y concentración mínima fungicida

En la Figura 12 se ejemplifica la confirmación de la CMI y CMF de PT sobre la C.6 determinada a través del método de microdilución en placa, en donde la CMI se fijó en 32 mg/mL y la CMF en 64 mg/mL para ambos propóleos.

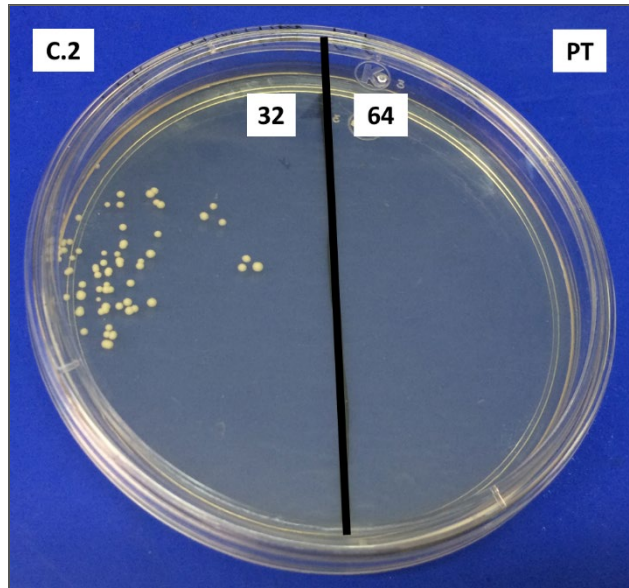


Fig. 12. CMI (**32 mg/mL**) y CMF (**64 mg/mL**) de PT sobre la C.2 de *M. pachydermatis*

Finalmente, en el gráfico de la Figura 13 se resumen los resultados de la CMI y CMF de ambos EEP frente a las cuatro cepas de *M. pachydermatis* evaluadas.

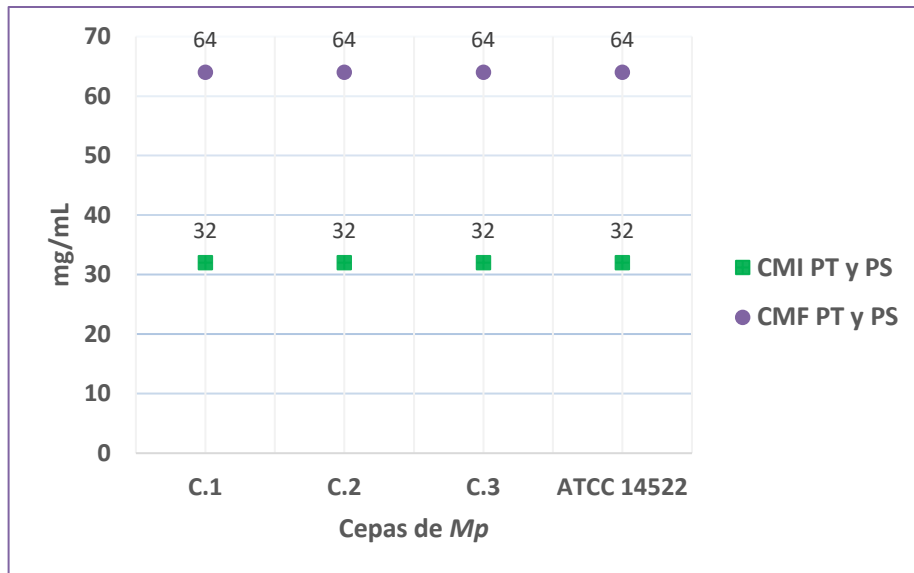


Fig. 13. Resumen de resultados de la CMI y CMF para el EEP de PT y PS frente a las cuatro cepas de *M. pachydermatis*

9. DISCUSIÓN

9.1. Análisis de la composición los EEP

Rodríguez *et al.* (2019c) mencionan que la temporada del año en la que se recolecta el propóleo es importante, ya que se ha identificado en algunos propóleos que en verano y otoño sólo hay presencia de terpenos y ausencia de compuestos fenólicos que son los responsables de la actividad antifúngica. Sin embargo, en el presente trabajo no se registró la época del año en que fueron recolectados los propóleos estudiados, por lo que es importante que futuras investigaciones comparativas recaben este importante dato.

Con relación al contenido total de fenoles y flavonoides, no todos los autores refieren sus resultados, no obstante, Paz (2018) evaluó dos EEP de *Apis mellifera* y determinó que uno contenía 23.26% de fenoles y 3.47% de flavonoides, mientras que el otro 27.64% y 3.56%, respectivamente. En la figura 14 se contrastan los resultados de Paz (2018) con los obtenidos en este estudio, pudiéndose observar que aunque el contenido total de fenoles del PT y PS se encuentra en menor concentración que en los evaluados por Paz (2018) no ocurre así con los flavonoides, por lo que el efecto terapéutico de los propóleos no está únicamente relacionado a la concentración de estos compuestos y se deben considerar otros parámetros que se comentarán más adelante.

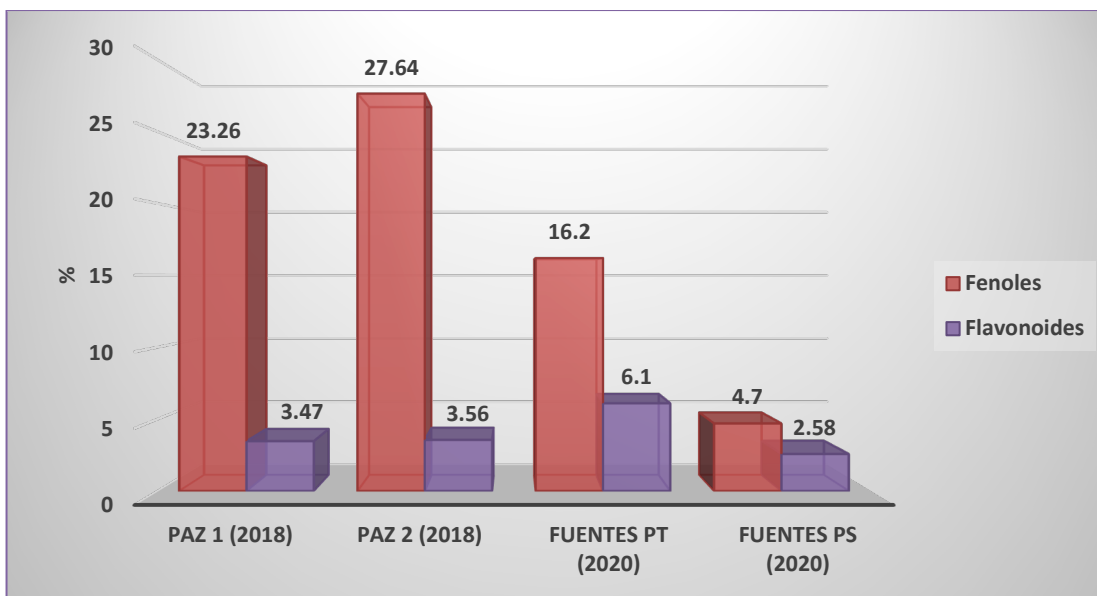


Fig. 14. Gráfica comparativa entre la cantidad de fenoles y flavonoides obtenida de la evaluación de dos diferentes EEP de *Apis mellifera* (Paz, 2018) y los del presente estudio (Fuentes, 2020)

En su tesis de doctorado, Rodríguez (2019a) explica que el contenido de fenoles y flavonoides en los propóleos se determina por la vegetación existente alrededor de los apiarios, el ciclo biológico de las plantas productoras de resinas, factores ambientales y el método de recolección del propóleo; tras evaluar individualmente la acción antimicrobiana de algunos flavonoides halló que por sí mismos no poseen actividad y apunta que la sinergia entre estos es la que los dota de efecto antimicrobiano. En el presente trabajo se observó que el rendimiento de cada propóleo fue diferente, al igual que su contenido de fenoles y flavonoides, no obstante, ambos obtuvieron actividad antimicótica; por lo tanto, estos resultados sustentan la idea de Rodríguez (2019a) que la actividad biológica del propóleo deriva en mayor grado de la sinergia entre sus compuestos que del origen vegetal, técnica y época de recolección, almacenamiento y conservación, especie de abeja, método y disolvente utilizado en la preparación del extracto (Rodríguez, 2015; Londoño, 2010).

Viloria *et al.* (2012) realizaron una caracterización fisicoquímica de 18 propóleos colombianos de *Apis mellifera* recolectados de tres apiarios y en tres épocas

diferentes, seis de ellos mediante técnica de raspado y el resto por uso de malla, los autores determinaron que no hubo diferencia significativa en el rendimiento de los EEP (obteniendo del 6.5 al 25.8%); no así en el contenido total de cera que fue superior en el caso de la recolección por raspado, obteniendo un porcentaje promedio de 15.80% frente a un 5.34% del recolectado por malla; y tampoco en la cantidad de material insoluble (impurezas) que fue mayor en el propóleo obtenido con malla (81.68%) respecto al conseguido por raspado (64.80%); de esta forma, los autores mencionan que el método de recolección por raspado o malla interfiere en la composición del propóleo en greña de *Apis mellifera*, pero no así en el rendimiento en la obtención de los extractos. En la presente tesis, el PT recolectado por raspado arrojó un mayor rendimiento que el PS recolectado por malla, además, y en contradicción a Vilorio *et al.* (2012) se observó que el rendimiento de los EEP está asociado a la composición del propóleo, ya que el extracto que se obtiene corresponde a la parte resinosa, descartando la porción cerera y las impurezas del propóleo en greña.

Por su parte, López (2016) caracterizó tres propóleos mexicanos de la misma región recolectados por el método de malla, pero usando diferentes variables en la elaboración de los EEP como método de extracción y porcentaje de alcohol etílico añadido; halló que para los tres propóleos el método por el cual se obtenía más EEP fue el de Soxhlet y en todos los casos, el mayor rendimiento se obtenía al disolver con etanol al 96%, así, el rendimiento más alto logrado fue de 93.87%; sin embargo, la actividad biológica se vio disminuida y explica que el método disuelve también ceras que no tienen efecto antimicrobiano, repercutiendo en las concentraciones de flavonoides que se ven disminuidas; los rendimientos finales de EEP obtenidos por sonicación con alcohol etílico al 96%, fueron aproximadamente del 40, 50 y 60% (se grafica, pero no se menciona la cifra exacta). Debido a que el método de extracción interviene en el rendimiento y en la actividad biológica, tanto el EEP de PS y PT se procesó a través del método de sonicación para evitar diluir la cera contenida en los propóleos y que ya anteriormente se mencionó que no tiene efecto antimicrobiano.

Flores (2018) reporta rendimientos de EEP de *Apis mellifera* de 14.05% y 20.43% a través de recolección por malla y extracción con alcohol etílico al 70%, no obstante, en el primer caso se eliminó el excedente de etanol por desecación a temperatura ambiente durante 1 mes y en el segundo utilizando un rotovapor. Lo que muestra que el método de eliminación de alcohol etílico interfiere en el rendimiento (ya que parte del extracto blando también se evapora) y sobre todo en el tiempo de elaboración de los EEP, derivado de ello, para la elaboración de los EEP de PS y PT se utilizó un rotovapor.

Con relación al rendimiento total, cabe resaltar que el método de recolección de propóleo es importante, sin embargo y pese a que la norma mexicana NOM-003-SAG/GAN-2017 recomienda el uso de rejillas plásticas en la apicultura, los meliponicultores han encontrado dificultades para aplicar este método en la producción de propóleo de abejas nativas. Por lo que para este estudio los propóleos evaluados fueron recolectados mediante uso de malla y raspado obteniendo rendimientos de EEP de 30.7% para PS y 49% para PT.

En el gráfico de la Figura 15 se comparan los rendimientos de los EEP obtenidos mediante recolección por malla y extracción por sonicación con alcohol etílico absoluto, por Viloría *et al.* (2012), López (2016) y los de la presente tesis (Fuentes, 2020), además de los obtenidos por Flores (2018) bajo diferentes técnicas. Obsérvese que, aunque los otros autores elaboraron EEP de *Apis mellifera*, Viloría (6.5 – 25.8%) y Flores (14.04 – 20.43%) obtuvieron rendimientos menores a los nuestros (30.7 – 49%), mientras que López (40 – 60%) consiguió extractos con concentraciones superiores. De esta forma, se observa que hasta ahora los parámetros para evaluar comparativamente el rendimiento de los EEP no son constantes y que no hay datos reportados con relación a los propóleos de *Scaptotrigona mexicana* y *Tetragonisca angustula* que especifiquen el método de recolección empleado, el método de extracción y el método de eliminación de etanol.

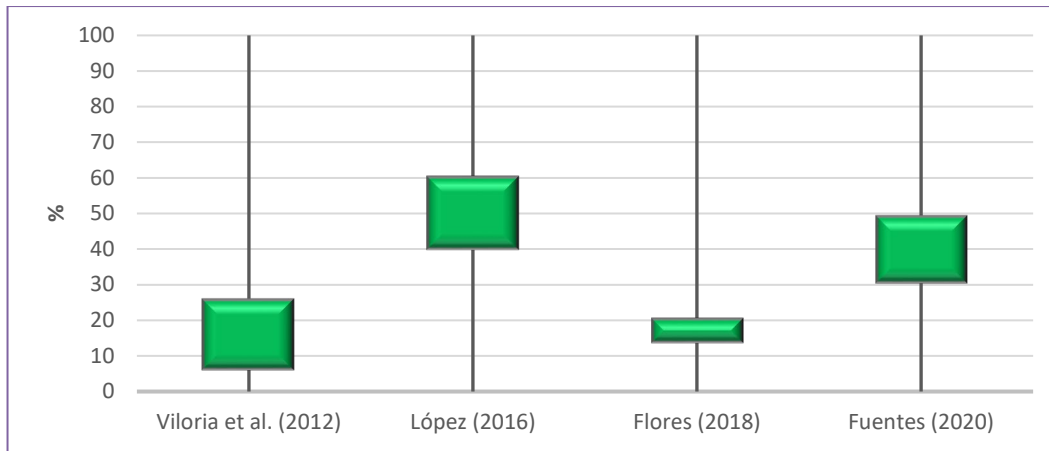


Fig. 15. Comparación de los rendimientos mínimos y máximos de los EEP del presente estudio y los reportados en la literatura

9.2. Análisis de la caracterización de cepas de *M. pachydermatis*

Guého *et al.* (2011) mencionan que algunos cultivos primarios de cepas clínicas de *M. pachydermatis* pueden requerir de lípidos para su crecimiento y que después de varias transferencias es que pueden crecer en agar Sabouraud. Hurtado *et al.* (2016) señalan que a diferencia de las demás especies de *Malassezia*, *M. pachydermatis* al no ser lipodependiente puede crecer en medios sin suplementos lipídicos, como SDA. Lo que resultó compatible con las cuatro cepas trabajadas en nuestro estudio. Además, Hurtado *et al.* (2016) indican que la temperatura óptima de crecimiento de las levaduras es a 32 °C, pero en el caso de las patógenas como *M. pachydermatis* estas pueden crecer hasta a 37 y 40 °C, lo que explica por qué todas las cepas del presente estudio crecieron dentro de estos rangos de temperatura. Basándonos en los resultados obtenidos por Tovar (2016), las cepas de *M. pachydermatis* se incubaron a constantes de 33 °C y durante 72h, aunque en ocasiones algunas cepas necesitaron más tiempo para su crecimiento.

Por otro lado, la literatura preliminar registra que el tamaño promedio de las levaduras de *M. pachydermatis* es de entre 2-2.5 μm de ancho y 4-5 μm de largo (Boekhout *et al.*, 2010; Guého *et al.*, 2011); sin embargo, los hongos levaduriformes del trabajo de Rodríguez (2014) presentaron un tamaño promedio de 2.4 por 3.2 μm y las de Hurtado *et al.* (2016) de 1.7 por 5.8 μm ; mientras que en el presente estudio se observó un tamaño promedio de 2.1 μm de ancho por

4.7 μm de largo. En el gráfico de la Figura 16 se comparan los tamaños de las levaduras observadas por los autores mencionados y las propias obtenidas, ultimando que los parámetros morfométricos para caracterizar a las especies de *Malassezia* no son determinantes y que se requiere la prueba de crecimiento en SDA para confirmar que se trata de *M. pachydermatis*.

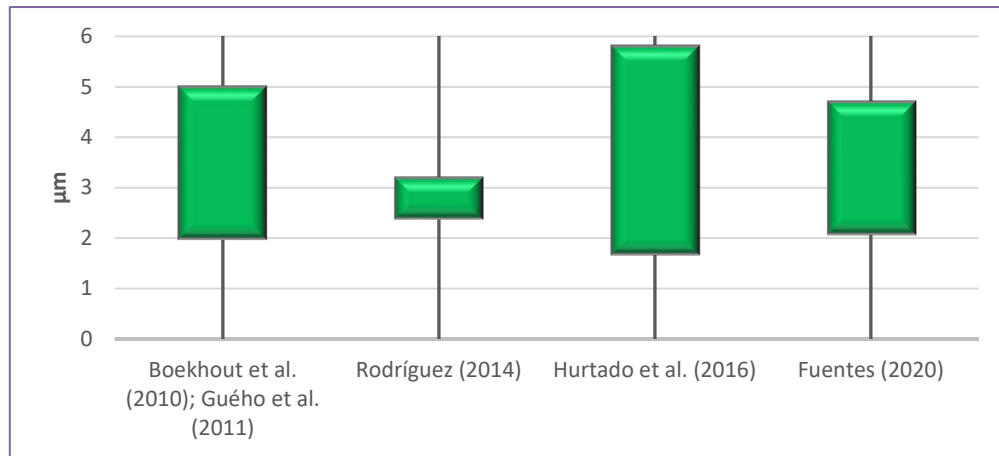


Fig. 16. Comparación de las dimensiones micrométricas de las levaduras de *M. pachydermatis* (donde el valor menor corresponde al ancho y el valor mayor al largo) reportadas por la literatura y las observadas en el presente trabajo (Fuentes, 2020)

Como se puede observar, los autores sugieren distintas pruebas para la identificación de las diferentes especies de *Malassezia* como tinción Gram para micrometría por microscopía, reacción de la catalasa, prueba de urea, β -glucosidasa, crecimiento en SDA o aDm a diferentes temperaturas, actividad fosfolipasa, asimilación de Tween 20, 40, 60 y 80 (Bejar *et al.*, 2014; Hurtado *et al.*, 2016). Sin embargo, para identificar a *M. pachydermatis* son suficientes dos pruebas: la observación de su morfología microscópica con forma de “suela de zapato” a través de tinción Gram y su crecimiento positivo en SDA ya que del género *Malassezia*, la única especie que puede crecer en este medio es *M. pachydermatis*, por lo que en nuestro trabajo no se realizaron todas las pruebas mencionadas en la literatura.

9.3. Análisis de la actividad antifúngica de los EEP

El principal objetivo de este trabajo era determinar si las muestras de propóleo de *S. mexicana* y *T. angustula* tenían actividad antifúngica sobre cepas de *M. pachydermatis* y los resultados obtenidos demostraron que ambos propóleos inhibieron el crecimiento de esta levadura.

En relación con la metodología empleada en la presente tesis, la prueba de difusión en agar mostró un comportamiento inexacto ya que la consistencia de los EEP de abejas nativas es más viscosa que la presentada por los EEP de *Apis mellifera*, dificultándose su absorción en los discos de papel Whatman y su posterior difusión sobre el medio para ejercer su acción antimicrobiana, por lo que los resultados debieron confirmarse o descartarse por medio del método cuantitativo de microdilución en placa, sin embargo, este método también presentó sus propias dificultades que se mencionarán más adelante.

Conforme a la actividad antimicótica del propóleo de *Apis mellifera* sobre *M. pachydermatis* observada en otros estudios en los que los EEP se obtuvieron a través de diferentes técnicas y de distintas procedencias, Lozina *et al.* (2006) reportaron una CMI de 0.30 mg/mL sin lograr determinar la CMF; Hernández (2009) arrojó una CMI de 100 mg/mL pero tampoco reportó la CMF; Cardoso *et al.* (2010) hallaron que su EEP presentó una CMF de 5.3 mg/mL pero no señalaron la CMI; Paz (2018) trabajó con dos EEP y los resultados que obtuvo fueron de una CMI de 0.44 mg/mL y una CMF de 1.22 mg/mL para el primer extracto y, una CMI de 0.27 mg/mL y una CMF de 0.33 mg/mL para el segundo; Buestán *et al.* (2018) investigaron tres EEP (frente a *Malasezia furfur*) y sus resultados para la CMI fueron de 25, 12.5 y 0.915 mg/mL, pero no determinaron la CMF. Se compararon estos resultados con los nuestros debido a que hasta el momento no hay otros estudios publicados que proporcionen parámetros de referencia al evaluar la actividad antimicótica de propóleos de abejas nativas ante *M. pachydermatis*, así, tanto para el PS como para el PT la CMI fue de 32 mg/mL y la CMF de 64 mg/mL. El análisis comparativo de la CMI y CMF obtenidas por los investigadores anteriores y nuestros resultados se resume en la Figura 17.

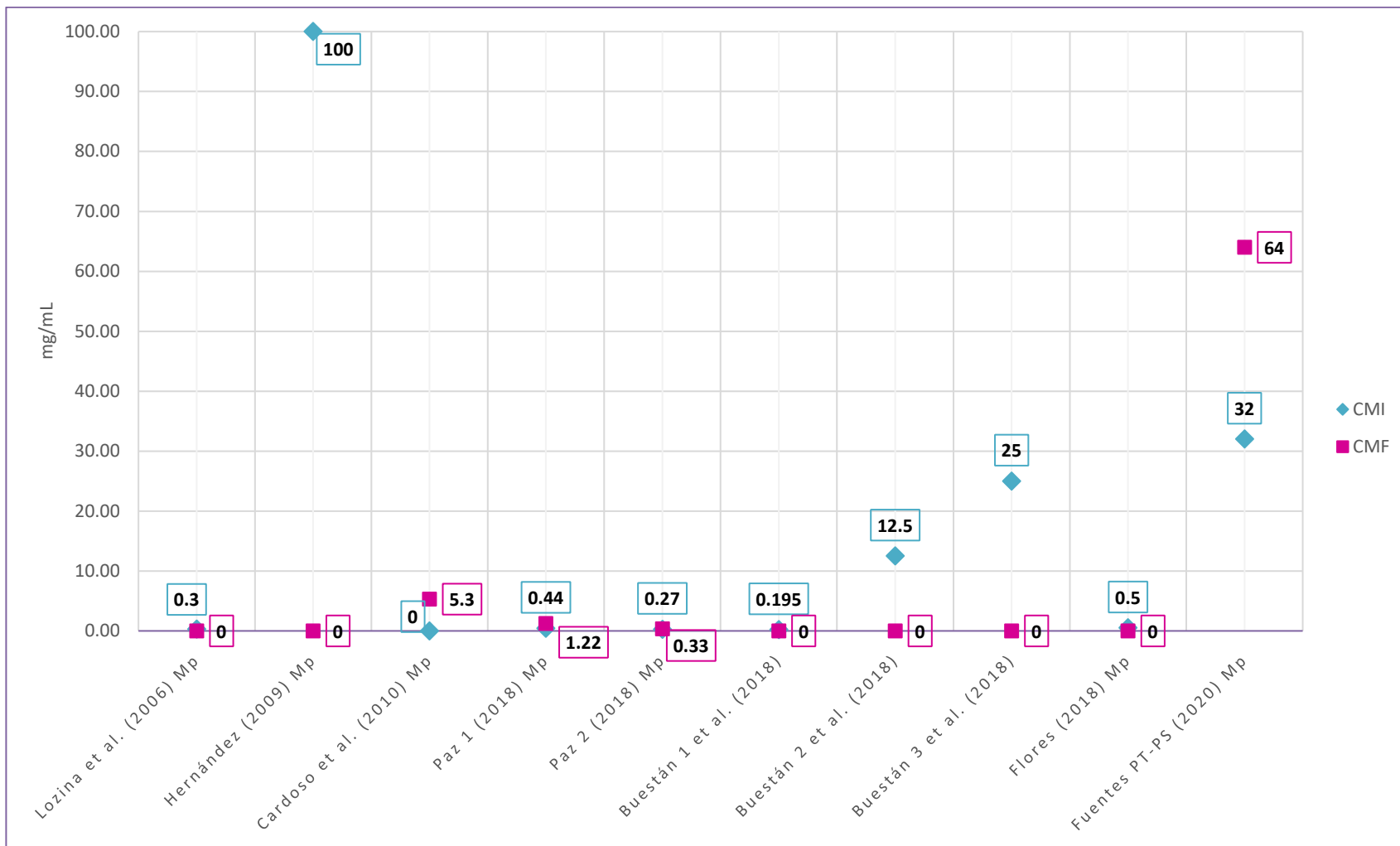


Fig. 17. Comparación de las CMI y CMF obtenidas por distintos autores y el presente trabajo, donde “Mp” indica que la cepa sobre la que se evaluó la actividad antimicrobiana de los extractos de propóleo fue *M. pachydermatis* y donde el valor de “0” representa que el autor no evaluó dicho dato. *Buestán et al. trabajaron con *M. furfur*

Se aprecia que la mayor CMI fue la reportada por Hernández (2009), mientras que la más baja fue la segunda muestra reportada por Paz (2018). También se observa que varios autores no determinaron la CMF, entre los que sí lo hicieron el índice más bajo lo obtuvo el segundo propóleo de Paz (2018) y el más alto fue el nuestro. Se reconoce que sí hay una correspondencia entre la cantidad total de fenoles y flavonoides y la actividad antifúngica del propóleo al observar los resultados de Paz (2018) y los nuestros. Se denota que los propóleos evaluados en nuestro estudio presentaron actividad antimicótica frente a *M. pachydermatis* pero que requirieron concentraciones elevadas de EEP para su acción.

Otro punto importante para discutir es el método de extracción y los solventes utilizados en las pruebas de actividad antifúngica de los EEP empleados por los distintos investigadores y su posible interferencia en los resultados. Por ejemplo, Hernández (2009) usó glicerina como solvente para la prueba cualitativa y detectó que su consistencia dificultaba el manejo del extracto, argumentó que no usó etanol porque al ser un antiséptico podría interferir con la evaluación antimicrobiana del propóleo y defendió el uso de dimetil-sulfóxido (DMSO) como disolvente para la prueba cuantitativa indicando que es inodoro con bajo nivel de toxicidad que penetra fácilmente al tejido epitelial. Buestán *et al.* (2018) declaran que usar calor en la elaboración de EEP se altera su composición química, lo que sugiere que al elaborar nuestros extractos a 60°C pudieron haberse modificado y afectado la actividad biológica de los propóleos. No obstante, cabe recordar que la tesis que se presenta trabajó por primera vez con propóleos de abejas nativas, de los cuales aún no se han estandarizado las técnicas de recolección, elaboración de extractos y menos aún, las pruebas de actividad antimicrobianas.

Tovar (2016) advierte que la determinación de la CMI y CMF de los EEP frente a *M. pachydermatis* no puede realizarse en microplacas ya que el propóleo genera turbidez que dificulta la lectura y propone su realización en tubo. Por nuestra parte, el inconveniente al que nos enfrentamos con relación a la técnica de microdilución en placa se debió a que el tiempo de incubación de esta levadura es de 3 a 7 días a mínimo 32°C, lapso durante el cual se corre el riesgo de desecación del escaso

medio, dificultando su evaluación. De modo que se sugiere para próximos trabajos probar con placas de ELISA de 24 pozos.

Por otra parte, es importante señalar que autores como Deegan *et al.* (2019) expresan preocupación al ignorar si altas concentraciones de EEP pueden inducir citotoxicidad. Por ejemplo, en un interesante estudio *in vitro* de Flores (2018) se evaluó el efecto de *M. pachydermatis* sobre células de riñón de conejo con morfología epitelial y el posterior resultado del propóleo sobre estas levaduras y células. Reportó que el EEP empleado generó inhibición de *M. pachydermatis* desde una concentración de 0.1 mg/mL pero con mejores resultados a 0.5 mg/mL, sin embargo, se observó que a esa concentración el EEP resultaba dañino a las células de riñón por lo que se buscó una concentración menor que fuera inofensiva para estas y la halló a 0.25 mg/mL. Por lo que el parámetro de citotoxicidad debe ser evaluado en futuras investigaciones.

En cuanto al mecanismo de acción del propóleo como agente terapéutico, Hee (2002) pudo observar que al aplicar propóleo coreano (sin reportar la especie de abeja de procedencia) sobre *Cryptococcus neoformans* ocurría el rompimiento de su superficie celular. Por su parte, Londoño (2010) también reportó la ruptura de la cubierta celular de *C. neoformans* tras ser tratada con EEP de *Apis mellifera* y planteó que esto ocurre por la interrupción en la síntesis de ergosterol y quitina de la membrana y pared celular fúngica. Tovar (2016) mostró a través de microscopía estereoscópica de barrido el cambio en la morfología de *M. pachydermatis* al ser tratada con EEP de *Apis mellifera*, la cual adquirió una apariencia esférica y rugosa con sitios de perforación en su pared celular y explicó que el mecanismo de acción del propóleo podría deberse a la presencia de pinocembrina y ácido benzoico que evitan la división celular, desorganizan la pared y citoplasma celular, inhiben la síntesis de proteínas y ácidos grasos, desnaturalizan proteínas de membrana y acidifican el citoplasma. Por su parte, en un reciente estudio Deegan *et al.* (2019) pudieron correlacionar el efecto antifúngico de los EEP de *Apis mellifera* contra *M. pachydermatis* con la cantidad total de fenoles y flavonoides y concluyeron que, a mayor concentración, el propóleo adquiere mejor actividad biológica y sostienen que el mecanismo de acción de los EEP se debe a la ruptura

de la pared celular. Consecuentemente, observamos que aún falta identificar con precisión los principios activos del propóleo y sus mecanismos de acción, ya que hay dos teorías respecto a la actividad antifúngica del propóleo, la que plantea que genera lisis de la pared celular y la que indica que daña la membrana celular al inhibir la síntesis de ergosterol.

Aunque Tovar *et al.* (2015) hacen hincapié en que la investigación *in vitro* de los usos del propóleo no refleja las condiciones reales que se presentan en la clínica, sí justifican su continuidad hacia la investigación en su fase *in vivo* y para el tratamiento de otitis canina producida por *M. pachydermatis* proponen la aplicación de gotas óticas lo suficientemente viscosas para que se mantengan adheridas al tejido epitelial del paciente.

10. CONCLUSIONES

1. Se demostró la actividad antifúngica de los propóleos de *Scaptotrigona mexicana* y *Tetragonisca angustula* al inhibir *in vitro* el crecimiento de *Malassezia pachydermatis*.
2. Se elaboró y evaluó la calidad de los EEP de acuerdo con la NOM-003-SAG/GAN-2017, en donde el propóleo de *T. angustula* además de presentar un mayor rendimiento cumplió con los mínimos porcentajes requeridos de compuestos fenólicos y flavonoides, en comparación al de *S. mexicana* que sólo cubrió los relativos a los flavonoides.
3. Ya que la NOM-0003-SAG/GAN-2017 está diseñada para *Apis mellifera*, se propone su adaptación para examinar los propóleos de abejas nativas.
4. Mediante la técnica de microdilución en placa se determinó una CMI de 32 mg/mL y una CMF de 64 mg/mL de los EEP de *S. mexicana* y *T. angustula* frente a *M. pachydermatis*.
5. Se observó que el método de difusión en agar recomendado por la NOM-003-SAG/GAN-2017 resulta inviable al evaluar la capacidad antifúngica de algunos propóleos de abejas nativas sin aguijón como *S. mexicana* y *T. angustula*.
6. Para determinar si es viable usar propóleo de abejas nativas como antifúngico para tratar casos clínicos de otitis canina, se considera necesario realizar más estudios.

11. PROSPECTIVAS

- Realizar futuras investigaciones que aporten mayores conocimientos sobre la actividad biológica de los propóleos de abejas nativas y que ayuden a determinar las técnicas ideales para la elaboración de extractos.
- Hacer más estudios comparativos de propóleos de abejas nativas sin aguijón procedentes de los mismos meliponarios pero recolectados en diferentes épocas del año.
- Evaluar *in vivo* la actividad antifúngica de los EEP de abejas nativas sin aguijón de forma experimental usando animales de laboratorio.
- Desarrollar la presente investigación hasta elaborar un producto apiterapéutico para el tratamiento contra *M. pachydermatis*.
- Efectuar una evaluación clínica del producto empleando perros o gatos con problemas de otitis.
- Realizar una evaluación de los costos finales de productos apiterapéuticos elaborados a partir de propóleos de abejas nativas sin aguijón.

12. ANEXOS

12.1. ANEXO 1. Agar Dixon modificado (ADm)

Ajustado de Tovar (2016).

1. Incorporar los siguientes elementos:

- Agua destilada = 1000 mL
- Agar (BD Bioxon) = 12 g
- Extracto de Malta (DIBICO) = 36 g
- Peptona micológica (Oxoid) = 6 g
- Twen 40 (SIGMA) = 1 mL
- Glicerol (JT Baker) = 2 mL
- Ácido Oleico (JT Baker) = 2 mL

2. Clarificar el medio.

3. Esterilizar a 121°C 15 lbs durante 15 minutos.

4. Dejar enfriar.

5. Agregar:

- Bilis de buey deshidratada = 20 g
- Antibiótico (Dermasel Selective Supplement SR 0075E) = 6 mL

6. Servir en cajas de Petri estériles.

7. Realizar prueba de esterilidad a 37°C durante 24 hrs.

8. El ADm es el medio ideal en cual crecen todas las especies del género *Malassezia*.

12.2. ANEXO 2. Sabouraud Dextrose Agar (SDA)

Según indicaciones del fabricante.

1. Incorporar los siguientes elementos:

- Agua destilada = 1000 mL
- Agar SDA (BD Bioxon) = 65 g

2. Clarificar el medio.

3. Esterilizar a 121°C 15 lbs durante 15 minutos.

4. Dejar enfriar.

5. Servir en cajas de Petri estériles.

6. Realizar prueba de esterilidad a 37°C durante 24 hrs.

7. Sembrar *M. pachydermatis* y dejar incubar por 72 hrs a 33°C.

8. *M. pachydermatis* es la única especie del género *Malassezia* que crece en este medio que no contiene compuestos lipídicos, ya que es una levadura no lipodependiente.

12.3. ANEXO 3. Tinción de Gram

1. Colocar sobre un portaobjetos una gota de agua estéril con la ayuda de un asa bacteriológica estéril y posteriormente tomar una asada directamente del medio donde se encuentra el microorganismo (en este caso de las levaduras sembradas en SDA). Homogeneizar el contenido. Fijar frotis pasando el portaobjetos rápidamente 2 o 3 veces sobre llama del mechero.
2. Agregar una gota de cristal violeta sobre el frotis y dejar actuar durante 1 minuto y lavar al chorro de agua sin que esta caiga directamente sobre el frotis.
3. Añadir una gota de lugol sobre el frotis y dejar actuar durante 30 segundos.
4. Con el portaobjetos en posición inclinada colocar acetona hasta que eliminar el lugol (2-3 segundos aprox.) y lavar al chorro de agua sin que esta caiga directamente sobre el frotis.
5. Poner una gota de safranina sobre el frotis y dejar actuar durante 1 minuto y lavar al chorro de agua sin que esta caiga directamente sobre el frotis.
6. Observar al microscopio óptico y medir tamaño con software Image-Pro Express®.
7. Las levaduras de *M. pachydermatis* reaccionan a la tinción como Gram +, es decir, se observan de una coloración morada y con un aspecto de “cacahuete” o “suela de zapato”. El tamaño de *M. pachydermatis* se encuentra en un rango de 2-2.5 μm a 4-6 μm .

12.4. ANEXO 4. Prueba de la catalasa

Modificado de Hurtado (2012).

1. Colocar una gota de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) sobre un portaobjetos.
2. Añadir una asada de la cepa y mezclar.
3. Observar reacción.
4. En una reacción positiva se forman burbujas, en una negativa hay ausencia de estas; si el microorganismo produce la enzima catalasa, descompone el H_2O_2 en agua y oxígeno ($H_2O + O_2$). *M. pachydermatis* es la única especie del género *Malassezia* que tanto puede dar a esta prueba un resultado positivo como uno negativo.

12.5. ANEXO 5. Prueba de la urea

El medio se prepara de acuerdo con el fabricante. Proceso modificado de Rodríguez (2014).

1. Incorporar los siguientes elementos:

- Agua destilada = 95 mL
- Urea Agar Base (Oxoid) = 2.4 g

2. Esterilizar a 115 °C 10 lbs durante 20 minutos.

3. Dejar enfriar a 50 °C.

4. Añadir 5 mL de solución estéril de Urea al 40% (Oxoid).

5. Servir 10 mL en tubos de ensayo estériles y dejar enfriar de forma inclinada.

6. Realizar prueba de esterilidad a 37°C durante 24 hrs.

7. Inocular una asada de la cepa sobre la superficie y dejar incubar durante 72 h a 33 °C.

8. En una reacción positiva el medio vira a un tono fucsia debido al indicar rojo de fenol. *M. pachydermatis* presenta la enzima ureasa que hidroliza la urea del medio y forma dos moléculas de amoniaco ($\text{Urea} + \text{H}_2\text{O} \xrightarrow{\text{Ureasa}} \text{CO}_2 + 2\text{NH}_3$), por lo que la reacción debe ser positiva.

12.6. ANEXO 6. Caldo Dixon

Realizar el mismo procedimiento para elaborar ADm, pero sin incorporar Agar.

13. BIBLIOGRAFÍA

1. Angileri, M., Pasquetti, M., De Lucia, M. y Peano, A. (2019). Azole resistance of *Malassezia pachydermatis* causing treatment failure in a dog. *Medical Mycology Case Reports*, 23, 58-61. doi. <https://doi.org/10.1016/j.mmcr.2018.12.004>
2. Arnold, N., Zepeda, R., Vázquez, M. y Aldasoro, M. (2018). Las abejas sin aguijón y su cultivo en Oaxaca, México: con catálogo de especies. ECOSUR-CONABIO-Remy Benoit Marie Vandame, San Cristóbal de Las Casas.
3. Ayala, R. (1999). Revisión de las abejas sin aguijón de México (*Hymenoptera: Apidae: Meliponini*). *Folia Entomol. Méx.*, 106, 1-123.
4. Bejar, V., Rojas, C., Guevara, J.M., Pareja, E., Huaman, A., Sevilla, R., Tapia, M., Zerpa, R., González, S., Villanueva, F., Valencia, E., Marocho, L. y Abanto, E. (2014). Identificación de especies de *Malassezia* aisladas de piel sana en pobladores de Lima, Perú. *An Fac med*, 75(2), 173-176.
5. Boekhout, T., Guého, E., Mayser, P. y Velegriaki, A. (2010). *Malassezia* and the skin. Springer, Heidelberg.
6. Buestán, A.R. y Torres, M.L. (2018). Estudio de la composición química y actividad antifúngica de extractos de propóleos de la región del austro ecuatoriano (Tesis de maestría). Universidad Politécnica Salesiana, Cuenca (Ecuador).
7. Cardoso, R.L., Maboni, F., Machado, G., Hartz, S. y Castagna, A. (2010). Antimicrobial activity of propolis extract against *Staphylococcus coagulase positive* and *Malassezia pachydermatis* of canine otitis. *Veterinary Microbiology*, 142, 432-434. doi. [10.1016/j.vetmic.2009.09.070](https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.09.070)
8. Deegan, K.R., Fonseca, M.S., Oliveira, D.C.P., Santos, L.M., Fernández, C.C., Hanna, S.A., Machado, B.A.S., Umsza, M.A., Meyer, R. y Portela, R.W. (2019). Susceptibility of *Malassezia pachydermatis* clinical isolates to allopatric antifungals and brazilian red, green, brown propolis extracts. *Frontiers in Veterinary Science*, 6(460), 1-12.
9. Flores, I.S. (2018). Evaluación del efecto del propóleo en cultivos celulares infectados con *Malassezia pachydermatis* (Tesis de maestría). Universidad Nacional Autónoma de México, Cuautitlán Izcalli (México).
10. Flores, I.S., Moreno, M., Londoño, A. y Cruz, T.A. (2016). Use of mexican propolis for the tropical treatment of dermatomycosis in horses. *Open Journal of Veterinary Medicine*, 6, 1-8.
11. Fuentes, D.B., Rodríguez, B., Tovar, N. y Cruz, A.T. (octubre 8 y 9, 2020). *Evaluación de la actividad antimicótica de propóleos de abejas nativas (Scaptotrigona mexicana y Tetragonisca angustula) sobre Malassezia*

- pachydermatis* para su potencial uso en otitis canina [Ponencia]. 2° Congreso de Disciplinas Microbiológicas. Cuautitlán Izcalli, Estado de México, México.
12. Gaviria, A. y Cruz, J.M. (2018). Otitis media en el perro: diagnóstico, tratamiento quirúrgico y posibles complicaciones. Revisión. *Rev Med Vet Zoot*, 65(2), 179-189. doi. <http://dx.doi.org/10.4236/ojvm.2016.61001>
 13. Gómez, J.A. (2009). Otitis crónica canina por *Malassezia pachydermatis* (Tesis de licenciatura). Universidad Autónoma Agraria “Antonio Narro”, Torreón (México).
 14. Gómez, R.L. (2018). Evaluación mediante microscopía electrónica de barrido del daño sobre la estructura celular de *Candida albicans* producido por propóleo mexicano (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, Cuautitlán Izcalli (México).
 15. González, P.A., Baena, M.L. y Rös, M. (2018). Abejas nativas, nuestras vecinas inadvertidas. *Biodiversitas*, 139, 2-5.
 16. Guého, E., Batra, R. y Boekhout, T. (2011). *Malassezia* Baillon. En Kurtzman, C.P., Fell, J.W. y Boekhout, T. (eds.). *The yeasts, a taxonomic study*, 5 ed. Elsevier, Amsterdam.
 17. Guzmán, F. (2018). La abeja prehispánica, mejor que la europea. *Gaceta UNAM*, 19 de febrero. doi. www.gaceta.unam.mx/la-abeja-prehispanica-mejor-que-la-europea/
 18. Guevara, M., Urcia, F. y Casquero, J. (2007). Manual de procedimientos y técnicas de laboratorio para la identificación de los principales hongos oportunistas causantes de micosis humanas. Ministerio de Salud-Instituto Nacional de Salud, Lima (Perú).
 19. Hee, Y.C. (2002). *In vitro* evaluation of the antifungal activity of propolis extract on *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans*. *Mycobiology*, 30(2), 93-95.
 20. Hernández, R. (2009). Efecto inhibitorio del extracto de propóleo en bacterias y levaduras causantes de otitis canina (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, Cuautitlán Izcalli (México).
 21. Hsieh, B.Y., Chao, W.H., Xue, Y.J. y Lai, J.M. (2018). A ketoconazole susceptibility test for *Malassezia pachydermatis* using modified Leeming-Notman Agar. *Journal of Fungi*, 126(4), 1-6. doi. <https://doi.org/10.3390/jof4040126>
 22. Hurtado, A. (2012). Caracterización fenotípica de aislamientos de *Malassezia* spp. de origen canino (Tesis de licenciatura). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá (Colombia).
 23. Hurtado, A., Pulido, A., Linares, M., Suárez, L., Castañeda, R. y Rodríguez, M. (2016). Caracterización fenotípica de aislamientos de *Malassezia* spp., de origen canino. *Rev. MVZ Córdoba*, 21(3), 5535-5546.

24. Hurtado, M. (2015). Caracterización molecular y morfométrica del género *Scaptotrigona* (Apidae: Meliponini) en Mesoamérica. Universidad de Murcia, Murcia (España).
25. Londoño, A. (2010). Estudio comparativo de la actividad antifúngica de un extracto de propóleo mexicano y de tres plantas que *Apis mellifera* usa para su producción (Tesis de doctorado). Instituto Tecnológico de Costa Rica - Universidad Nacional Autónoma de México, Cuautitlán Izcalli (México).
26. López, A.A. (2016). Caracterización química de un propóleo de la delegación de Milpa Alta recolectado por el método de la malla (Tesis de licenciatura), Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México (México).
27. Lozina, L., Boehringer, S., D'Aquino, M. y Acosta, O. (2006). Eficacia del propóleo sobre *Malassezia pachydermatis*. Correlación de diferentes técnicas *in vitro*. *Acta Farm Bonaerense*, 25(4), 560-563.
28. Lozina, L.A., Peichoto, M.E., Boehringer, S.I., Koscinczuk, P., Granero, G.E. y Acosta, O.C. (2010). Efficacy of Argentine propolis formulation for tropical treatment of canine otitis externa. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 62(6), 1359-1366.
29. Morales, H. (2015). Perfil de HPLC, RMN y actividad biológica de extractos etanólicos de geopropóleos de abejas meliponas de la región centro de Veracruz (Tesis de licenciatura). Universidad Veracruzana, Xalapa (México).
30. Morales, R. (2007). Las paredes celulares de levadura de *Saccharomyces cerevisiae*: un aditivo natural capaz de mejorar la productividad y salud del pollo de engorde (Tesis de doctorado). Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona (España).
31. Nijima, M., Kano, R. y Nagata, M. (2011). An azole-resistant, isolate of *Malassezia pachydermatis*. *Veterinary Microbiology*, 149(1-2), 288-290.
32. Norma Oficial Mexicana NOM-003-SAG/GAN-2017. Propóleos, producción y especificaciones para su procesamiento. *Diario Oficial de la Federación*, DCCLXIX (6), 27-35.
33. Paz, K. (2018). Evaluación de la actividad antimicótica de los propóleos mexicanos contra cepas clínicas de *Malassezia pachydermatis* (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, Cuautitlán Izcalli (México).
34. Ramírez, J. (1996). Las abejas, prodigio de la naturaleza. *Biodiversitas*, 2(6), 2-8.
35. Rejas, J. (2008). Dermatits canina por *Malassezia*. *Red Vet*, 9(5), 1-14.
36. Rodríguez, B. (2015). Perfil químico de propóleos mexicanos para su aplicación en medicina veterinaria (Tesis de maestría). Universidad Nacional Autónoma de México, Cuautitlán Izcalli (México).
37. Rodríguez, B. (2019a). Potencialización antimicrobiana de dos propóleos mexicanos para su aplicación en casos de medicina veterinaria (Tesis de

- doctorado). Universidad Nacional Autónoma de México, Cuautitlán Izcalli (México).
38. Rodríguez, B., Canales, M.M., Penieres, J.G. y Cruz, T.A. (2019b). Composición química, propiedades antioxidantes y actividad antimicrobiana de propóleos mexicanos. *Acta Universitaria* 29, e2435. doi. <http://doi.org/10.15174.au.2020.2435>
 39. Rodríguez, B., Penieres, J.G., Canales, M.M., Luna, R.A. y Cruz, T.A. (2019c). Potencialización de la actividad antifúngica de propóleos mexicanos con la adición de chalconas sintetizadas. *Biotechnia*, XXI (3), 76-85.
 40. Rodríguez, D.M. (2014). Caracterización de especies de *Malassezia* como microbiota comensal en la piel de equinos (Tesis de licenciatura). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá (Colombia).
 41. Salamanca, G. (2017). Origen, naturaleza, propiedades fisicoquímicas y valor terapéutico del propóleo. Universidad de Tolimá, Ibagué (Colombia).
 42. Sánchez, R., Calle, S., Falcón, N. y Pinto, C. (2011). Aislamiento antibacteriano en casos de otitis canina y su susceptibilidad antibiótica. *Rev Inv Vet Perú*, 22(2), 161-166.
 43. Sihelská, Z., Concová, E., Váczi, P. y Harcárová, M. (2019). Antifungal susceptibility of *Malassezia pachydermatis* isolates from dogs. *Folia Veterinaria*, 63(2), 15-20.
 44. Silva, F.A. (2017). Avances en técnicas de conservación de *Malassezia pachydermatis* y estudio de su sensibilidad a diferentes drogas (Tesis de doctorado). Universidad de Las Palmas de Gran Canaria, Las Palmas de Gran Canaria (España).
 45. Silva, M., Torres, A. y Hoffmann, W. (2016). Determinación de propiedades fisicoquímicas de propóleos provenientes de cinco especies de abejas sin aguijón de Norte de Santander-Colombia. *Revista Bistua*, 14(1), 3-16.
 46. Tovar, N. (2016). Evaluación antimicótica *in vitro* del propóleo mexicano sobre *Malassezia pachydermatis* (Tesis de maestría). Universidad Nacional Autónoma de México, Cuautitlán Izcalli (México).
 47. Tovar, N., García, L. y Cruz, T.A. (2015). Propolis in dogs: clinical experiences and perspectives (a brief review). *Open Journal of Veterinary Medicine*, 5, 11-17. doi. <http://dx.doi.org/10.4236/ojvm.2015.51002>
 48. Vilorio, J.D., Gil, J.H., Durango, D.L. y García, C.M. (2012). Caracterización fisicoquímica del propóleo de la región del Bajo Cauca antioqueño (Antioquia, Colombia). *Biología en el sector agropecuario y agroindustrial*, 10(1), 77-86.
 49. Wild, A. (S/a). *Tetragonisca angustula* [Fotografía]. <https://www.alexanderwild.com/Insects/Insect-Orders/Bees-Wasps-and-Sawflies/n-2S8CZ/i-zcXgDPx>