



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
CARRERA DE CIRUJANO DENTISTA

**Actividad antifúngica del propóleo de
Chihuahua sobre aislados clínicos de *Candida*.**

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE CIRUJANO DENTISTA

PRESENTA:

LEILANY RIVERA YÁÑEZ

Director de Tesis:

Dr. Oscar de Jesús Nieto Yáñez



Tlalnepantla, Edo. de Méx., Diciembre, 2022.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A la Carrera de Cirujano Dentista.

A la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al apoyo recibido por parte de la UNAM mediante:

- El Programa de Becas para Titulación-Egresados Extemporáneos 2021-2022, con número de Folio: 735112.

Al Comité Tutor:

- Dra. Nelly Rivera Yáñez.
División de Investigación y Posgrado, FES-Iztacala, UNAM.
- C.D. Francisco Javier Alvarado López.
Carrera de Cirujano Dentista, FES-Iztacala, UNAM.
- Esp. Pabel Antonio Gómez Hernández.
Clínica Odontológica FES-Aragón, UNAM.
- C.D. Felipe Ramos Rodríguez.
Clínica Odontológica FES-Aragón, UNAM.

Al Sr. José Luis González, por el propóleo.

A la Dra. Karla Mariela Hernández Sánchez y a la Dra. María Elena Vargas Díaz del Laboratorio de Química de Productos Naturales del Departamento de Química Orgánica de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, por su apoyo y participación en el análisis y caracterización de la composición química del propóleo.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
1 Candida	4
1.1 Candidiasis	5
1.2 Epidemiología	7
1.3 Tratamiento	8
2 Medicina alternativa y complementaria	10
2.1 Propóleo: definición y antecedentes	10
2.1.1 Composición química	11
2.1.2 Actividad anti- <i>Candida</i> del propóleo	12
3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	14
4 HIPÓTESIS	14
5 JUSTIFICACIÓN	15
6 OBJETIVOS	16
6.1 Objetivo general	16
6.2 Objetivos específicos	16
7 MATERIAL Y MÉTODOS	17
7.1 Obtención y preparación del extracto etanólico de propóleo	17
7.2 Obtención de muestras clínicas de <i>Candida</i> oral de pacientes	17
7.3 Identificación de las especies de <i>Candida</i>	17
7.4 Evaluación cualitativa de la actividad anti- <i>Candida</i>	18
7.5 Evaluación cuantitativa de la actividad anti- <i>Candida</i>	18
7.6 Ensayo de Inhibición del crecimiento del tubo germinativo de <i>Candida</i>	19
7.7 Análisis de la composición química del propóleo	20
7.8 Análisis estadístico.....	20
7.9 Consideraciones éticas y legales	20
8 RESULTADOS	22
8.1 Identificación de la especie de <i>Candida</i> oral	22
8.2 Evaluación de la actividad cualitativa del propóleo sobre <i>Candida</i>	23
8.3 Evaluación de la actividad cuantitativa del propóleo sobre <i>Candida</i>	24
8.4 Inhibición del crecimiento del tubo germinativo de <i>Candida</i>	25
8.5 Composición química del propóleo Mexicano	28
9 DISCUSIÓN	30
10 CONCLUSIONES	35
11 Referencias	36

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fotografías representativas de la identificación de las diferentes especies de <i>Candida</i>	22
Figura 2. Fotografías representativas de los halos de inhibición de la actividad antifúngica del propóleo mexicano frente a diferentes especies de <i>Candida</i>	24
Figura 3. Microfotografías representativas (40X) del efecto inhibitorio del propóleo en el crecimiento del tubo germinativo de <i>C. albicans</i>	27
Figura 4. Estructura química de los flavonoides presentes en el propóleo mexicano	29

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Evaluación cualitativa de la actividad anti- <i>Candida</i> del propóleo	23
Tabla 2. Evaluación cuantitativa de la actividad anti- <i>Candida</i> del propóleo mexicano	25
Tabla 3. Efecto del propóleo mexicano sobre la inhibición del crecimiento del tubo germinativo de <i>C. albicans</i>	26

RESUMEN

Las infecciones causadas por microorganismos del género *Candida* se están convirtiendo en un problema de salud creciente a nivel mundial. Estos hongos son comensales oportunistas que pueden producir infecciones, conocidas clínicamente como candidiasis, en individuos inmunocomprometidos. El uso indiscriminado de diferentes tratamientos antifúngicos ha desencadenado la resistencia de especies de *Candida* a las terapias utilizadas actualmente. En este sentido, se ha demostrado que el propóleo tiene potentes propiedades antimicrobianas y, por lo tanto, puede utilizarse como un enfoque para la inhibición de especies de *Candida*. Por lo tanto, este trabajo tiene como objetivo evaluar los efectos anti-*Candida* de un extracto de propóleo obtenido del norte de México en aislamientos clínicos de especies de *Candida*. Específicamente se identificaron especies de *Candida* a partir de lesiones bucales y se evaluaron los efectos cualitativos y cuantitativos anti-*Candida* del propóleo mexicano, así como su efecto inhibitorio sobre el crecimiento del tubo germinativo y la composición química del aislado de *C. albicans*. Se identificaron tres especies de *Candida* y nuestros resultados indicaron que los halos de inhibición del propóleo oscilaron entre 7.6 y 21.43 mm, mientras que los de CFM y CF₅₀ oscilaron entre 0.312 y 1.25 y entre 0.014 y 0.244 mg/mL, respectivamente. Además, se descubrió que el propóleo inhibía la formación de tubos germinativos (CI₅₀ que oscilaba entre 0.030 y 1.29 mg/mL). El análisis de la composición química indicó la presencia de flavonoides, incluidos pinocembrina, baicaleína, pinobancosina, chalcona, ramnetina y biocanina A, en el extracto de propóleo mexicano. En resumen, nuestro trabajo muestra que el propóleo mexicano presenta importantes efectos anti-*Candida* relacionados con su composición química, además de inhibir el crecimiento del tubo germinativo. Otros factores de virulencia de especies de *Candida* deben abordarse en futuras investigaciones para determinar los mecanismos asociados con los efectos antifúngicos contra ellos.

ABSTRACT

Infections caused by microorganisms of the genus *Candida* are becoming a growing health problem worldwide. These fungi are opportunistic commensals that can produce infections, clinically known as candidiasis, in immunocompromised individuals. The indiscriminate use of different antifungal treatments has triggered the resistance of *Candida* species to currently used therapies. In this sense, propolis has been shown to have potent antimicrobial properties and thus can be used as an approach for the inhibition of *Candida* species. Therefore, this work aims to evaluate the anti-*Candida* effects of a propolis extract obtained from the north of Mexico on clinical isolates of *Candida* species. *Candida* species were specifically identified from oral lesions, and both the qualitative and quantitative anti-*Candida* effects of the Mexican propolis were evaluated, as well as its inhibitory effect on *C. albicans* isolate's germ tube growth and chemical composition. Three *Candida* species were identified, and our results indicated that the inhibition halos of the propolis ranged from 7.6 to 21.43 mm, while that of the MFC and FC₅₀ ranged from 0.312 to 1.25 and 0.014 to 0.244 mg/mL, respectively. Moreover, the propolis was found to inhibit germ tube formation (IC₅₀ ranging from 0.030 to 1.29 mg/mL). Chemical composition analysis indicated the presence of flavonoids, including pinocembrin, baicalein, pinobanksin chalcone, rhamnetin, and biochanin A, in the Mexican propolis extract. In summary, our work shows that Mexican propolis presents significant anti-*Candida* effects related to its chemical composition, and also inhibits germ tube growth. Other *Candida* species virulence factors should be investigated in future research in order to determine the mechanisms associated with antifungal effects against them.

INTRODUCCIÓN

El ser humano a lo largo de su existencia ha tenido que combatir con diversas enfermedades, en los últimos años las infecciones causadas por hongos son más recurrentes, siendo los pacientes inmunosuprimidos mucho más afectados [1].

Candida es el hongo más reportado, siendo este el responsable de las dermatomicosis mucocutáneas humanas debido a su alta capacidad para colonizar e infectar uñas, piel y mucosas, que van desde manifestaciones clínicas leves en individuos inmunocompetentes hasta enfermedades potencialmente fatales en pacientes inmunodeprimidos o inmunocomprometidos [1, 2].

El tratamiento que se deriva es generalmente con fármacos azólicos y polienicos, aunque tienen una buena efectividad se ha observado una resistencia antifúngica, la cual, nos indica que es fundamental buscar alternativas terapéuticas que complementen al esquema de acción contra *Candida* [3, 4].

Para lograr atacar al hongo oportunista, se puede hacer uso de la medicina tradicional, en este ámbito se emplean distintos extractos o esencias naturales. El propóleo es una sustancia espesa, la cual las abejas van mezclando de distintas flores. El producto final realizado por las abejas se ha investigado, demostrando así que tiene bastante potencial para el desarrollo de fármacos antifúngicos sin efectos adversos como toxicidad [5, 6].

México se caracteriza por tener una enorme variedad de productos naturales, pero hablando de reportes de propóleo mexicano sobre *Candida*, hay muy poca información. Debido lo anterior en esta tesis se aborda la investigación del efecto que tiene el propóleo mexicano obtenido en el estado de Chihuahua sobre *Candida*, para de esta forma dar pie a nuevos fármacos basados en propóleo, ayudando, así como complemento en infecciones con hongos.

1 *Candida*

Candida es un hongo dimórfico [7], de acuerdo a su morfología puede presentarse como levadura o como hongo filamentoso. Generalmente son oportunistas y atacan al paciente cuando su sistema inmune se encuentra susceptible, de esta forma *Candida* afecta con distinta gravedad a las personas [8].

De esta manera el hongo se va a establecer en el portador cuando, el pH, la temperatura y el potencial redox sean favorables para su crecimiento. Tomando en cuenta lo anterior, en la mayoría de los casos estos parámetros no son favorables para *Candida*. Estas levaduras han evolucionado a través del tiempo modificando los mecanismos de defensa del huésped [9].

Las micosis se pueden clasificar, de acuerdo con su topografía, en cuatro grupos:

- A. Micosis generalizadas o profundas: Estas afectan fundamentalmente los órganos internos. A menudo se hallan diseminadas en el organismo y afectan distintos tejidos.
- B. Micosis subcutáneas: Afectan la piel, tejido subcutáneo, fascias y huesos.
- C. Micosis cutáneas: Pueden afectar la epidermis, cabellos y uñas. Los hongos responsables de estas infecciones se denominan dermatofitos.
- D. Micosis superficiales: Afectan sólo los cabellos y capas más superficiales de la epidermis [10].

La clasificación anterior no detalla la micosis provocada por hongos de bajo poder patógeno, la cuales pueden ser localizadas o estar invadiendo diferentes órganos y sistemas dependiendo del daño inmunológico que presente el hospedero [11], debido a que el delicado equilibrio entre huésped y hongo patógeno puede convertirse en una relación parásita y resultar en una grave enfermedad [12].

Candida albicans es un hongo dimórfico [13] su morfología puede variar, siendo levaduriforme o crecer como hongo filamentoso formando hifas verdaderas, es un organismo eucarionte, diploide, desprovisto de reproducción sexual que puede

desarrollarse, multiplicarse y colonizar diferentes ambientes. Su nombre proviene del latín *candidus* y *albicans*, participio presente de *albicare* (blanco). Esta especie se ubica en la siguiente clasificación taxonómica:

- I. *Phylum Ascomycota*
- II. *Subphylum Saccharomycotina*
- III. Clase *Saccharomycetes*
- IV. Orden *Saccharomycetales*
- V. Familia *Saccharomycetaceae*
- VI. Género *Candida*
- VII. Especie *C. albicans*

Candida se aloja en las membranas mucosas del paciente, tales como la cavidad bucal, tracto respiratorio e intestinal y hasta en la mucosa vaginal. Dicha levadura se aprovecha del estado inmunológico para desarrollarse y así, poder infectar. Dicho lo anterior, *Candida* existe en la microbiota normal de un humano sano, en hasta un 30-60% [14-23].

1.1 Candidiasis

Este término se le adjudica a toda infección generada por especies del género "*Candida*".

La cual se divide respectivamente en 4 fases:

- 1) **Colonización** en ésta participan la adhesión epitelial y adquisición de nutrientes por medio de la acción de adhesinas, enzimas hidrolíticas, formación de hifas y cambio de fenotipo.

- 2) **Infección superficial:** en esta etapa es importante la penetración epitelial por medio de degradación de proteínas del hospedero por enzimas hidrolíticas y formación de hifas.
- 3) **Infección profunda:** participan la penetración tisular, invasión vascular y evasión inmune por medio de enzimas hidrolíticas y también la formación de hifas.
- 4) **Infección diseminada:** *C. albicans* la realiza a través de la adherencia al endotelio, infección de tejidos del hospedero, activación del sistema de coagulación por intervención de adhesinas, enzimas hidrolíticas, formación de hifas nuevamente y cambio de fenotipo. Estudios in vitro, en animales y humanos, han implicado a las proteinasas como factor de virulencia en *C. albicans* [10].

La enfermedad es de amplio espectro, es decir, que puede simplemente afectar a las membranas y al tejido tegumentario o ser crónico pudiendo ser mortal. Otra variante es las sistémicas la cual afecta enormemente a los pacientes inmunosuprimidos, por qué su diagnóstico puede pasar desapercibido ya que el paciente es asintomático de los patognomónicos, así mismo su pronóstico es reservado debido a lo difícil que es aislar el hongo en los hemocultivos [24-26].

La candidiasis se agrupa en tres categorías:

- a) **Candidiasis cutánea.** La infección de la piel, uñas y mucosas por *Candida* puede ser causada por condiciones que dan como resultado la maceración crónica de estas áreas, cambios fisiológicos en el huésped o estado inmune comprometido [12]. Un ejemplo es el intertrigo que se presenta en pliegues húmedos de la piel, entre las nalgas o ingles de personas con obesidad o en los dedos de trabajadores que conservan sus manos todo el día en el agua y suelen tener la piel macerada [11].

- b) **Candidiasis sistémica.** Numerosas manifestaciones sistémicas de candidiasis pueden ocurrir luego de la introducción de candida en el torrente circulatorio. Puede haber candidemia como resultado de contaminación de catéteres, procedimientos quirúrgicos, traumatismo de la piel o tracto gastrointestinal o aspiración [12]. Durante la diseminación, la infección puede afectar prácticamente cualquiera o muchos órganos, en especial riñones, sistema nervioso central, corazón y ojos [11].
- c) **Candidiasis mucocutánea crónica (CMC).** Esta condición se define como una condición invariablemente con *C. albicans* de cualquiera o de todas las superficies epiteliales del cuerpo, piel, mucosa oral, tracto respiratorio superior, epitelio gastrointestinal, urinario y genital, cabe mencionar que la CMC comienza tempranamente y a menudo persiste durante toda la vida [12].

1.2 Epidemiología

Las infecciones por hongos son responsables de más de un millón de muertes humanas al año y son una causa cada vez más importante de mortalidad y morbilidad [27]. En los últimos años, las infecciones por hongos han aumentado significativamente, siendo considerablemente alto en pacientes inmunosuprimidos [5].

Es importante destacar que la incidencia en las tasas anuales de infecciones nosocomiales del torrente sanguíneo causado por candida a principios de siglo presentaba una variabilidad de 6.0 a 13.3 y de 1.9 a 4.8 casos por 100,000 habitantes en Estados Unidos y Europa, respectivamente [28-30].

1.3 Tratamiento

Antifúngicos

Los antimicóticos son sustancias que alteran la estructura de la célula fúngica, siendo así capaz de inhibir su desarrollo afectando la capacidad de supervivencia, activando a los sistemas de defensa del huésped.

Los antifúngicos más comunes son:

1. **Polienos**: son macrólidos con cadenas insaturadas con una gran actividad antifúngica se caracterizan por una escasa biodisponibilidad digestiva, una baja solubilidad en agua y su alta toxicidad lo que obligó a detener el desarrollo de casi todas estas moléculas, a excepción de anfotericina B y de nistatina [31, 32]. La anfotericina B ha sido durante casi cuatro décadas el único fármaco disponible para el tratamiento de la infección fúngica invasora [33].
2. **Azoles**: Son moléculas sintéticas con un anillo de cinco carbonos unido a una cadena alifática con un grupo fenilo. Existen dos familias de azoles que se distinguen por las moléculas de nitrógeno que contiene el anillo azólico, dos en el caso de los imidazoles y tres en el de los triazoles. Los triazoles como fluconazol, itraconazol, voriconazol y posaconazol muestran una afinidad cientos de veces superior por las enzimas fúngicas que por las enzimas humanas, de ahí que muestren mucha menos toxicidad que los imidazoles, por lo que pueden administrarse a dosis más elevadas. Los azoles actúan inhibiendo la enzima citocromo P-450 que interviene en la síntesis del ergosterol, que es el mayor esteroide de la membrana celular del hongo. Se ligan a un nitrógeno libre del anillo azol inhibiendo la 14^α demetilación del lanosterol, llevando a la depleción del ergosterol, lo que finalmente afecta la permeabilidad de la membrana del hongo y los sistemas enzimáticos unidos a la membrana, involucrados en la síntesis de la pared celular. La selectividad de los azoles por la enzima P-450 del hongo está dada por la unión del N1 del grupo aromático de los azoles a aminoácidos

específicos de la membrana celular del hongo que no están presentes en las proteínas de los mamíferos [34].

3. **Equinocandinas**: son lipopéptidos anfófilos semisintéticos, pertenecientes a una familia de fármacos de la clase de las candinas. Su actividad antifúngica fue descubierta por azar en sus dos prototipos: echinocandina B y aculeacín A en la década de 1970 [35]. La principal novedad de estos antifúngicos es su mecanismo de acción, ya que actúan sobre la 1,3-beta-glucan sintetasa, enzima necesaria para la formación de polímeros de 1,3-beta-glucano, uno de los componentes de la pared fúngica. La inhibición de esta enzima reduce la síntesis del glucano, lo que causa inestabilidad osmótica en la célula fúngica y su posterior muerte [36]. Ellas se unen a una proteína KS1P, pero aún no se sabe si el sitio de unión a esta proteína es interno o externo a la membrana celular [37].

Desafortunadamente, el bajo número de tratamientos disponibles y el mal uso de los medicamentos antimicóticos han llevado a la selección de microorganismos resistentes [3], que es por qué la búsqueda de agentes antimicóticos nuevos, efectivos y económicos es crucial para superar mecanismos de resistencia existentes [5]. Diferentes productos naturales de distintos lugares y las latitudes llegan a constituir un grupo poco explorado de agentes con capacidad antifúngica; de todo estos, el propóleo tiene especial relevancia [5], ya que estudios recientes lo han evaluado como un producto con potencial para el desarrollo de fármacos antifúngicos sin toxicidad [38, 39].

2 Medicina alternativa y complementaria

2.1 Propóleo: definición y antecedentes

El término propóleo se deriva de dos palabras griegas, pro (que significa para o en defensa de) y polis (que significa la ciudad) así, propoleo significa en defensa de la ciudad o colmena [40].

El propóleo es una mezcla resinosa natural y compleja producida por las abejas por mezclar productos recolectados en yemas de árboles, plantas, savia, resinas y otras fuentes vegetales [6] con cera de abejas y enzimas salivales (β -glucosidasa) [41]. El propóleo es duro y quebradizo. Resina cuando hace frío, o blanda, flexible y muy pegajosa cuando hace calor; posee diferentes coloraciones, incluyendo marrón, verde y rojo [40, 41]. Las abejas usan el propóleo para cubrir superficies, sellar los orificios y cerrar los espacios, manteniendo la humedad y la temperatura estables en la colmena durante todo el año, proporcionando así un ambiente estéril que los protege de microbios y organismos productores de esporas, incluidos hongos y mohos [42]. Además, Las abejas utilizan el propóleo como sustancia de embalsamamiento para momificar a los invasores, como otros insectos, que han sido asesinados y son demasiado pesados para sacarlos de la colonia [42, 43].

En la antigüedad los griegos, romanos y egipcios fueron los pioneros en utilizar propóleo, con aplicaciones para la cicatrización de heridas y como sustancia desinfectante, se cree que se había usado desde el 300 a.C. [40, 44, 45]. Muchas otras civilizaciones antiguas, como la china, la india, y las culturas árabes, también utilizaron propóleo para tratar afecciones médicas como lesiones cutáneas [46].

Existen bastantes informes que muestran las aplicaciones del propóleo en el tratamiento de diversas enfermedades, debido a sus propiedades antibacterianas, antifúngicas, antiparasitarias, antivirales, propiedades antioxidantes, antiinflamatorias, antitumorales e inmunomoduladoras, entre muchos otros [47-54].

2.1.1 Composición química

Hoy en día se pueden encontrar estudios sobre la composición química y efectos biológicos del propóleo. Así mismo investigadores analizaron un gran número de muestras de diferentes regiones geográficas, demostrando que su composición química es muy variable y difícil de establecer porque depende de factores como la vegetación, la estación en el sitio de recolección [42, 55] y las especies de abejas [56]. El propóleo se compone generalmente de 50% resina, 30% cera, 10% aceites esenciales, 5% polen y 5% otras sustancias, que incluyen minerales y compuestos orgánicos [42]. Además, muestras de propóleos de varias regiones del mundo contienen más de 300 compuestos químicos diferentes [57].

Siendo de esta forma el propóleo rico en minerales como magnesio, calcio, yodo, potasio, sodio, cobre, zinc, manganeso y hierro; vitaminas como B1, B2, B6, C, E y D, además de la provitamina A; algunos ácidos grasos; y enzimas derivadas de la secreción glandular de las abejas o posiblemente del polen, tales como succínica deshidrogenasa, adenosina trifosfatasa, glucosa-6-fosfatasa, ácido fosfatasa, α -amilasa, β -amilasa, α -lactamasa, β -lactamasa, maltasa, esterasa y transhidrogenasa. Polisacáridos como almidón y di- y monosacáridos glucosa, La fructosa, ribosa, ramnosa, talosa, gulosa y sacarosa también están comúnmente presentes en propóleos [58, 59].

Además, en su compleja composición química se han identificado más de 600 compuestos químicos diferentes [54], derivados de la amplia gama de materias primas que utilizan las abejas para hacer este producto resinoso natural [60]. Aunque los componentes del propóleos varían dependiendo en gran medida de la región geográfica, la mayoría de los estudios han informado de un gran número de metabolitos secundarios, como terpenoides y polifenoles (flavonoides, ácidos fenólicos, y sus ésteres), entre otros [54].

Como se menciona anteriormente la composición general del propóleo depende del área de recolección. Las muestras de propóleo de Europa, América del Norte, y otras zonas templadas se componen principalmente de flavonoides (pinocembrina,

pinobanksina, quercetina, crisina y galangina) y ácidos fenólicos y sus ésteres [61]. El continente americano, por su tamaño, contiene una amplia diversidad de ecosistemas que aportan características muy particulares.

2.1.2 Actividad anti-*Candida* del propóleo

A lo largo de la historia, el ser humano ha utilizado productos naturales como el propóleo para aliviar enfermedades de diferentes etiologías [62]. En su extenso período de uso, el propóleo se ha utilizado para el tratamiento de infecciones bacterianas [63, 64], fúngicas [65, 66], virales [67, 68] y parasitarias [69, 70]. En la actualidad, es bien sabido que posee propiedades antiinflamatorias [71, 72], propiedades antitumorales [73, 74], antidiabéticas [75, 76] e inmunomoduladoras [54, 77].

Se pueden encontrar numerosas referencias en la literatura sobre el uso de propóleos para aliviar diferentes condiciones de origen microbiano, como es el caso de la candidiasis, una enfermedad causada por varias especies del género *Candida*.

Actualmente se está discutiendo el uso de productos naturales como una alternativa para combatir las infecciones fúngicas [78]. Un producto natural recientemente estudiado a nivel mundial es el propóleo, el cual ha demostrado eficacia frente a diferentes cepas fúngicas, entre ellas *Candida* sp. [5, 66, 79-83]. En este sentido, se ha reportado que muestras de propóleos de diferentes países como Polonia, Irán, Camerún, Brasil, República Checa, Irlanda y Alemania presentan actividad antifúngica tanto cualitativa como cuantitativa de manera diferente en cepas de *Candida* de referencia como *C. albicans* (ATCC 10231, 90028, 66396; CBS 562; NR 29450; SC 5314), *Candida krusei* (ATCC 6258, 90878; CBS 573), *Candida parapsilosis* (ATCC 22019; CBS 604), *Candida glabrata* (CBS 07; DSM 11226; LMA 90-1085), *Candida tropicalis* (ATCC 9968; CBS 94) y *Candida dubliniensis* (CBS 7987), y en aislados clínicos de *Candida* obtenidos de frotis de la boca y la garganta, así como líquido de la cavidad peritoneal, broncopulmonar lavado, estoma, sangre,

orina, heces y ano, identificados como *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis* y *C. parapsilosis* [5, 79, 81, 83-86]. Considerando las propiedades del propóleo de diferentes países, en este trabajo nos enfocamos en evaluar el efecto del propóleo mexicano sobre aislados clínicos de *Candida* sp. y su capacidad para inhibir la formación de tubos germinativos, así como para determinar su composición química.

3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Tendrá el propóleo de Chihuahua actividad antifúngica contra la *Candida* sp. aislada de casos clínicos?

4 HIPÓTESIS

Si se ha reportado que los propóleos de diferentes regiones geográficas tienen actividad contra *Candida* sp. y si se ha demostrado que muchos propóleos comparten varios compuestos bioactivos. Entonces es probable que el propóleo mexicano del estado de Chihuahua tenga actividad contra *Candida* sp.

5 JUSTIFICACIÓN

Las infecciones fúngicas siguen siendo un gran problema de salud, afectando principalmente a pacientes inmunodeprimidos. Las especies del género *Candida* son el agente más común de estas infecciones causando un amplio espectro de estados clínicos, que van desde las enfermedades agudas de membranas y la piel, a las crónicas que a veces pueden llegar a ser mortales.

Los fármacos de primera línea utilizados convencionalmente para tratar estas infecciones son cada vez menos efectivos por lo que se ha recurrido al uso de fármacos que tiene una mayor toxicidad y diversos efectos adversos como la anfotericina B. La medicina alternativa ofrece una gama muy diversa de opciones para tratar diversos padecimientos incluso los fúngicos y algunos productos apícolas como el propóleo han demostrado tener efectos antifúngicos que son prometedores. Sin embargo, este producto tiene una composición química compleja y altamente variable dependiendo de la región geográfica y de la vegetación que visitan las abejas para coleccionar diversas sustancias florales, motivo por el cual las actividades biológicas y antimicrobianas varían entre los distintos propóleos. Hasta la fecha los productos apícolas originarios de México han sido poco estudiados, por lo que en este trabajo proponemos estudiar y determinar la actividad anti-*Candida* del propóleo de Chihuahua. Esto fortalecerá y ayudará para un uso adecuado del propóleo y brindará una alternativa accesible a las comunidades que aún recurren a la medicina tradicional.

6 OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Evaluar el efecto del propóleo de Chihuahua sobre aislados clínicos de Candidiasis oral.

6.2 Objetivos específicos

1. Obtener muestras clínicas de pacientes con *Candida* oral mediante exudado bucal.
2. Identificar la especie de *Candida* oral de cada uno de los aislados clínicos mediante cultivo selectivo de CHROMagar.
3. Evaluar la actividad cualitativa del propóleo sobre las diferentes especies de *Candida* aisladas de pacientes mediante el método de difusión en agar.
4. Determinar cuantitativamente la actividad anti-*Candida* del propóleo sobre cada una de las especies de levadura aisladas de pacientes mediante el método de microdilución en caldo.
5. Evaluar el efecto del propóleo sobre el tubo germinativo (mecanismo de patogenicidad) de *C. albicans* identificada en las muestras de pacientes.
6. Identificar la composición química del extracto de propóleo de Chihuahua mediante Resonancia Magnética Nuclear.

7 MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Obtención y preparación del extracto etanólico de propóleo

El extracto de propóleo de Chihuahua fue donado por la Doctora Nelly Rivera Yáñez quien recolectó el propóleo del apiario del señor José Luis González, ubicado en el municipio de Chihuahua, Chihuahua, México, en diciembre de 2018. Para el extracto etanólico se maceraron 335g de propóleo con 1 Litro de etanol y este proceso se realizó varias veces (una vez por semana durante 7 semanas) hasta observar un tono muy claro en la maceración. El rendimiento del extracto fue de 216.64 g, lo que equivale al 64.67% del propóleo puesto a macerar. El extracto de propóleo se almacenó a 4°C en la oscuridad.

7.2 Obtención de muestras clínicas de *Candida* oral de pacientes

Diez muestras de *Candida* fueron donadas por la Clínica Odontológica Periférica de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala (FES-Iztacala) con sede en la FES-Aragón, de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), quienes las obtuvieron bajo el consentimiento informado de los pacientes. Las muestras se obtuvieron de casos clínicos con sospecha de infección por *Candida* mediante el frotis de los sitios lesionados en la cavidad oral con un hisopo de algodón estéril. Posteriormente, cada una de las muestras orales obtenidas se colocaron en cajas de Petri que contenían PDA (Potato Dextrose Agar) y se incubaron durante 48 h a 37° C para su crecimiento.

7.3 Identificación de las especies de *Candida*

Las muestras de *Candida* de las cajas Petri que contenían PDA se sembraron posteriormente en cajas Petri que contenían medio de cultivo CHROMagar™ *Candida*, utilizado como medio cromogénico en la caracterización diferencial presuntiva de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei* y *C. glabrata* mediante la

evaluación de colonias de color verde claro a medio, azul verdoso a azul metálico, rosa claro y crema, respectivamente, que caracterizan a estas levaduras y según lo indicado en las pautas del fabricante. Las muestras se incubaron a 37° C durante 48 h para su crecimiento y posterior identificación.

7.4 Evaluación cualitativa de la actividad anti-*Candida*

La actividad anti-*Candida* cualitativa del propóleo mexicano se determinó por el método de difusión en disco. Se impregnaron discos de papel filtro (5 mm de diámetro) con 10 mg de propóleo, 25 µg de nistatina (control positivo) o 10 µL de etanol (control negativo). Las diferentes especies de *Candida* se cultivaron para su crecimiento en 10 mL de caldo Sabouraud a 37° C durante 48 h antes de la interacción con el propóleo, para posteriormente inocular cajas Petri que contenían PDA sumergiendo un hisopo estéril en una suspensión estándar de 1×10^6 UFC/mL de los cultivos de cada *Candida* sp. y sembrarla uniformemente sobre toda la superficie del agar. Finalmente, los diferentes discos (previamente impregnados) se colocaron por triplicado en el agar inoculado, y las placas se dejaron en la incubadora durante 48 h a 37° C. Transcurrido el tiempo de incubación, se determinaron los diámetros del halo de inhibición que presentaban las sustancias ensayadas, medido en milímetros (mm) y reportado como halos de inhibición.

7.5 Evaluación cuantitativa de la actividad anti-*Candida*

La actividad anti-*Candida* cuantitativa del propóleo mexicano se determinó mediante la microtécnica de dilución en caldo. Las diferentes especies de *Candida* se cultivaron para su crecimiento en 10 mL de caldo Sabouraud a 37° C durante 48 h antes de la interacción con el propóleo. Posteriormente, en una placa de 96 pozos, se añadieron 150 µL por pozo de las diferentes concentraciones del propóleo (15 concentraciones seriadas de 20 a 0.001 mg/mL.) o Nistatina (7 concentraciones seriadas de 10 a 0.156 mg/mL.) a ensayar (por triplicado), luego se agregaron a los

pozos 50 μ L de la suspensión estándar (1×10^6 UFC/mL) de cada *Candida* cultivada, y luego la placa se incubó durante 48 h a 37° C. Transcurrido este tiempo, se tomó una muestra de cada pozo y se sembraron en cajas Petri septadas (que contenían agar PDA) y se incubaron durante 48 h a 37° C para posteriormente realizar el recuento de las UFC en cada una de las concentraciones de propóleo ensayadas. Finalmente, se determinó la Concentración Fungicida Mínima (CFM), la Concentración Fungicida al 75% (CF₇₅) y la Concentración Fungicida Media (CF₅₀) del propóleo y se reportaron las concentraciones en mg/mL.

7.6 Ensayo de Inhibición del crecimiento del tubo germinativo de *Candida*

El ensayo de Inhibición del crecimiento del tubo germinativo. Se realizó únicamente con muestras de aislados clínicos identificados como *C. albicans*, los cuales fueron cultivados para su crecimiento en 10 mL de caldo Sabouraud a 37° C durante 48 h antes de la interacción con el propóleo mexicano. Con base en la CFM, CF₅₀ y CF₂₅ determinadas en el ensayo cuantitativo de la actividad anti-*Candida* de propóleos, se probaron diferentes concentraciones seriadas de 2.5 a 0.312 mg/mL para CFM, y para probar la CF₅₀ y CF₂₅ se usó el doble de concentración determinada en el ensayo cuantitativo. Se agregó suero fetal bovino a tubos de microcentrífuga, luego se agregó un inóculo de la suspensión estándar (1×10^6 UFC/mL) del cultivo sembrado para cada *Candida* y se agregaron inmediatamente las diferentes concentraciones de propóleo a ensayar. Finalmente, los tubos se incubaron durante 4 h a 37° C; las pruebas se realizaron por triplicado. Después de la interacción, se tomó una alícuota de cada tubo para contar las levaduras con crecimiento de tubo germinativo en la cámara de Neubauer. Se determinó la concentración inhibitoria al 50% (CI₅₀) del propóleo y se reportaron las concentraciones en mg/mL.

7.7 Análisis de la composición química del propóleo

El propóleo (1 g) fue fraccionado por cromatografía en columna en un sistema de hexano:diclorometano:acetato de etilo (Hex:CH₂Cl₂:AcOEt) (fase estacionaria: flash de gel de sílice; volumen de fracción:50 mL; sistema de elución:6:3:1). Se obtuvieron 189 fracciones, las cuales fueron analizadas por cromatografía en capa fina (TLC). Las fracciones F40, F75, F80, F101, F130 y F160 fueron seleccionadas y analizadas por resonancia magnética nuclear (RMN) ¹H y ¹³C para determinar la presencia de compuestos fenólicos y flavonoides. Para complementar el análisis químico, las fracciones se analizaron mediante espectrometría de masas utilizando el método de ionización por electrospray en modo negativo (ESI-MS). La identificación de los compuestos se basó en la comparación directa de sus datos espectrales con los informados en la literatura [87].

7.8 Análisis estadístico

Todos los datos se expresan como media ± desviación estándar (DE). Para determinar el CFM, CF₇₅, CF₅₀ y CI₅₀ del propóleo, se realizó un análisis de regresión logarítmica utilizando el software GraphPad Prism versión 9.3.1 (GraphPad Software Inc.). Las concentraciones se informan en mg/mL. Para los datos de actividad cualitativos y cuantitativos, se realizó un análisis estadístico ANOVA de dos vías, seguido de la prueba de Tukey. $p < 0.05$ se consideró significativo.

7.9 Consideraciones éticas y legales

Las muestras de *Candida* aisladas de pacientes fueron donadas por el Especialista en Patología Bucal Pabel Antonio Gómez Hernández, con sede en la Clínica Odontológica de FES-Aragón. A los pacientes se les entregó un consentimiento informado en donde se les explicó cada uno de los procedimientos que se realizaron para aislar la muestra de *Candida*, si el paciente está de acuerdo se realizó el exudado. Los datos y confidencialidad del paciente fueron resguardados por el

Especialista Pabel Antonio Gómez Hernández, apegándose a todas las normas nacionales e internacionales que garantizan la correcta realización de procedimientos, así como de la información del paciente.

8 RESULTADOS

8.1 Identificación de la especie de *Candida* oral

Con base en la morfología y coloración que caracterizan a cada especie de *Candida* y siguiendo las indicaciones de las guías del fabricante, a través de CHROMagar™ *Candida* se identificaron tres muestras como *C. krusei* correspondientes al Caso Clínico 1 (CC1), CC5 y CC9 (Fig. 1A, mitad inferior de la caja de Petri, colonias de *Candida* color rosa), también se identificaron seis muestras como *C. albicans* que corresponden a CC2, CC3, CC4, CC7, CC8 y CC10 (Fig. 1A (mitad superior de la caja Petri), 1B (mitad superior e inferior de la caja Petri) y 1C (mitad inferior de la caja Petri), colonias de *Candida* color verde), y finalmente, se identificó una muestra como *C. glabrata* (Fig. 1C mitad superior de la caja Petri, colonias de *Candida* color crema) que corresponde a CC6. Todas las muestras de *Candida* sp. fueron aisladas de la lengua de los pacientes.

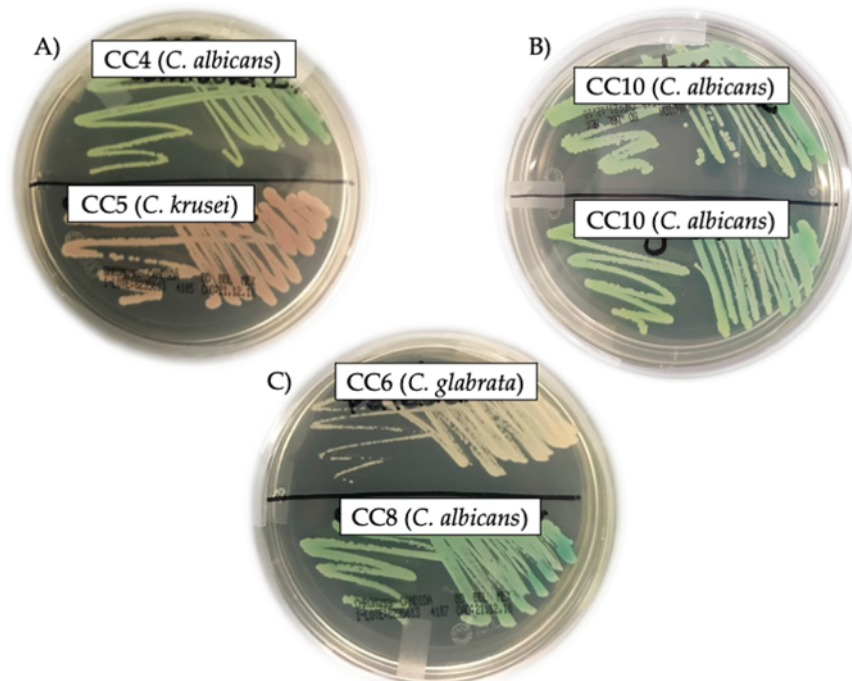


Figura 1. Fotografías representativas de la identificación de las diferentes especies de *Candida*. A) Mitad superior de la caja Petri CC4 (*C. albicans*), mitad inferior de la

caja Petri CC5 (*C. krusei*). B) Mitad superior e inferior de la caja Petri CC10 (*C. albicans*). C) Mitad superior CC6 (*C. glabrata*), mitad inferior CC8 (*C. albicans*).

8.2 Evaluación de la actividad cualitativa del propóleo sobre *Candida*

Encontramos que el propóleo mexicano presentó actividad antifúngica en los 10 diferentes aislados clínicos de *Candida* evaluados, pero con distintos grados de actividad. Los resultados se muestran en la Tabla 1, indicando que *C. glabrata* de CC6 fue la más sensible al propóleo, ya que exhibió halos de inhibición de 21.43 ± 1.30 mm. En contraste, *C. krusei* de CC5 presentó los halos de inhibición más pequeños (solo 7.60 ± 0.10 mm). En la Figura 2 se muestran varias fotografías representativas de los halos de inhibición que indican la actividad antifúngica del propóleo.

Tabla 1. Evaluación cualitativa de la actividad anti-*Candida* del propóleo.

Cepa de <i>Candida</i>	Muestra	Propóleo (mm)	Nistatina (mm)
<i>C. krusei</i>	CC1	8.83 ± 0.11	9.7 ± 0.58
	CC5	7.60 ± 0.10	20.1 ± 0.98
	CC9	8.82 ± 0.11^f	19.5 ± 0.87^f
<i>C. albicans</i>	CC2	9.80 ± 0.26	19.0 ± 1.00
	CC3	9.50 ± 0.34	18.0 ± 1.00
	CC4	8.83 ± 0.28	18.7 ± 1.15
	CC7	9.80 ± 0.10^f	19.5 ± 0.45^f
	CC8	9.56 ± 0.55^f	18.4 ± 1.21^f
	CC10	10 ± 1^f	21.3 ± 1.01^f
<i>C. glabrata</i>	CC6	$21.43 \pm 1.30^{a, b, c, d, e}$	$36.7 \pm 1.88^{a, b, c, d, e}$

Los halos de inhibición se informan en milímetros (datos promedio de tres repeticiones). El propóleo mexicano se probó a una concentración de 10 mg por disco. Todos los valores se expresan como la media \pm SD. (a) en comparación con el grupo CC1; (b) en comparación con el grupo CC2; (c) en comparación con el grupo

CC3 ^(d) en comparación con el grupo CC4; ^(e) en comparación con el grupo CC5; ^(f) en comparación con el grupo CC6. En todos los casos, el valor de p fue < 0.05 .

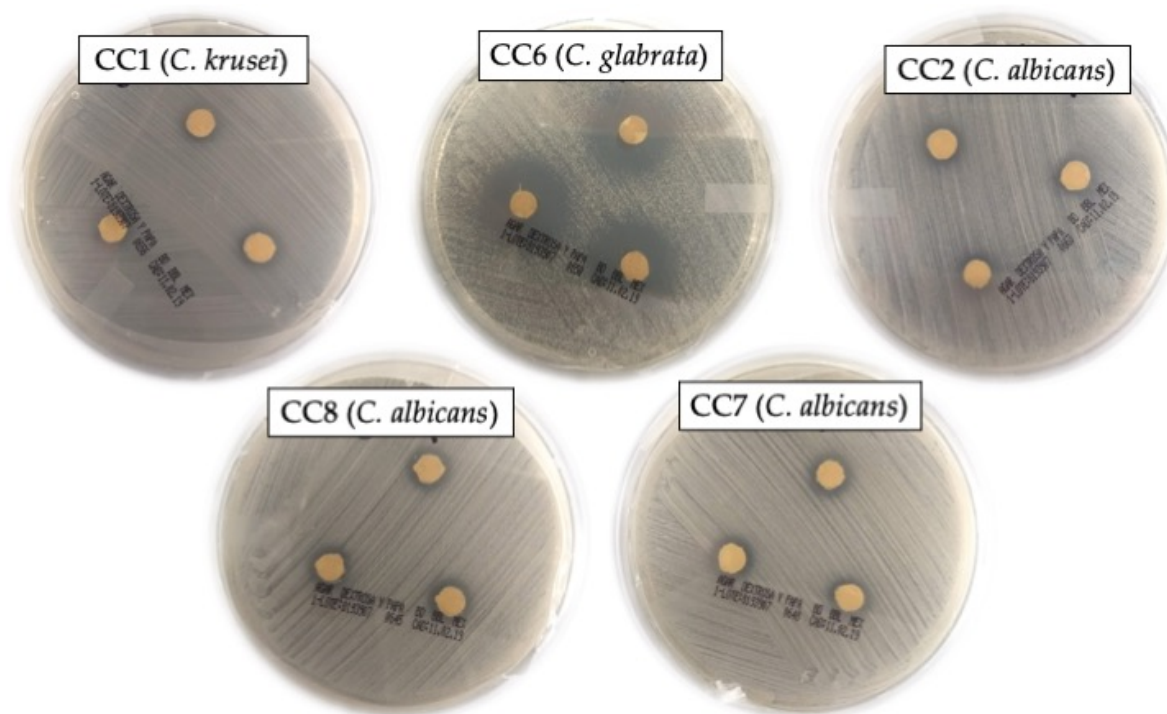


Figura 2. Fotografías representativas de los halos de inhibición de la actividad antifúngica del propóleo mexicano frente a diferentes especies de *Candida*.

8.3 Evaluación de la actividad cuantitativa del propóleo sobre *Candida*

Del análisis cuantitativo de la actividad antifúngica del propóleo mexicano se obtuvieron datos interesantes, ya que todas las especies de *Candida* presentaron diferentes concentraciones de inhibición. Los aislados CC2 y CC3 (ambos *C. albicans*) y CC6 (correspondiente a *C. glabrata*), presentaron un CFM de 0.312 mg/mL. En contraste, CC4, CC7 y CC10 (*C. albicans*) y CC5 (*C. krusei*) informaron un CFM de 1.25 mg/mL. Además, la muestra más sensible al propóleo fue *C. albicans* de CC7, que exhibió una CF_{75} de 0.019 ± 0.0067 mg/mL y una CF_{50} de 0.014 ± 0.0031 mg/mL. En el mismo sentido, CC4 y CC5 fueron las muestras menos

susceptibles al propóleo, presentando una CF_{75} de 0.492 ± 0.0220 mg/mL y una CF_{50} de 0.244 ± 0.0080 mg/mL, respectivamente. Los resultados de esta prueba se detallan en la Tabla 2.

Tabla 2. Evaluación cuantitativa de la actividad anti-*Candida* del propóleo mexicano.

Cepa de <i>Candida</i>	Muestra	Propóleo Mexicano			Nistatina		
		CFM	CF_{75}	CF_{50}	CFM	CF_{75}	CF_{50}
<i>C. krusei</i>	CC1	0.625 *	0.195 ± 0.0135	0.107 ± 0.0075	0.005	0.0037 ± 0.0012	0.0025 ± 0.0015
	CC5	1.25 *	0.331 ± 0.0150	0.244 ± 0.0080	0.010	0.0067 ± 0.0023	0.0041 ± 0.0015
	CC9	0.625 *	0.234 ± 0.0185	0.109 ± 0.0110	0.005	0.0033 ± 0.0017	0.0020 ± 0.0012
<i>C. albicans</i>	CC2	0.312 *	0.098 ± 0.0215	0.059 ± 0.0142	0.002	0.0018 ± 0.0010	0.0011 ± 0.0012
	CC3	0.312 *	0.075 ± 0.0165	0.048 ± 0.0090	0.002	0.0016 ± 0.0006	0.0010 ± 0.0015
	CC4	1.25 *	0.492 ± 0.0220	0.237 ± 0.0195	0.010	0.0073 ± 0.0020	0.0048 ± 0.017
	CC7	1.25 *	0.019 ± 0.0067	0.014 ± 0.0031	0.010	0.0055 ± 0.0021	0.0031 ± 0.0020
	CC8	0.625 *	0.028 ± 0.0045	0.018 ± 0.0020	0.005	0.0026 ± 0.0023	0.0015 ± 0.0021
	CC10	1.25 *	0.021 ± 0.0030	0.015 ± 0.0015	0.010	0.0065 ± 0.0025	0.0039 ± 0.0017
<i>C. glabrata</i>	CC6	0.312 *	0.059 ± 0.0131	0.030 ± 0.0055	0.002	0.0015 ± 0.0020	0.0009 ± 0.0010

CFM, CF_{75} y CF_{50} se reportan en mg/mL. Todos los valores se expresan como la media \pm SD. (*) $p < 0,05$ en comparación con el grupo de nistatina.

8.4 Inhibición del crecimiento del tubo germinativo de *Candida*

La concentración a la que se inhibió completamente el crecimiento del tubo germinativo en el CC2 (Fig. 3B) y CC8 fue de 1.25 mg/mL. De manera similar, en el CC3, CC4, CC7 (Fig. 3E) y CC10 la concentración de 2.5 mg/mL inhibió completamente el crecimiento del tubo germinativo en estas muestras. Además, al determinar la concentración a la que el propóleo inhibe el 50% del crecimiento del tubo germinativo en cada uno de los aislados clínicos, encontramos la CI_{50} más baja (0.019 ± 0.0015 mg/mL) para el CC10, y la CI_{50} más alta (1.29 ± 0.0141 mg/mL) para el CC4; los datos detallados se describen en la Tabla 3. En la Figura 3, se

muestran microfotografías representativas (40X) del efecto inhibitorio del propóleo en el crecimiento del tubo germinativo de *C. albicans*.

Tabla 3. Efecto del propóleo mexicano sobre la inhibición del crecimiento del tubo germinativo de *C. albicans*.

<i>C. albicans</i>	CI₅₀
CC2	0.108 ± 0.0021
CC3	0.138 ± 0.0012
CC4	1.29 ± 0.0141
CC7	0.033 ± 0.0006
CC8	0.030 ± 0.0010
CC10	0.019 ± 0.0015

CI₅₀ se reportan en mg/mL

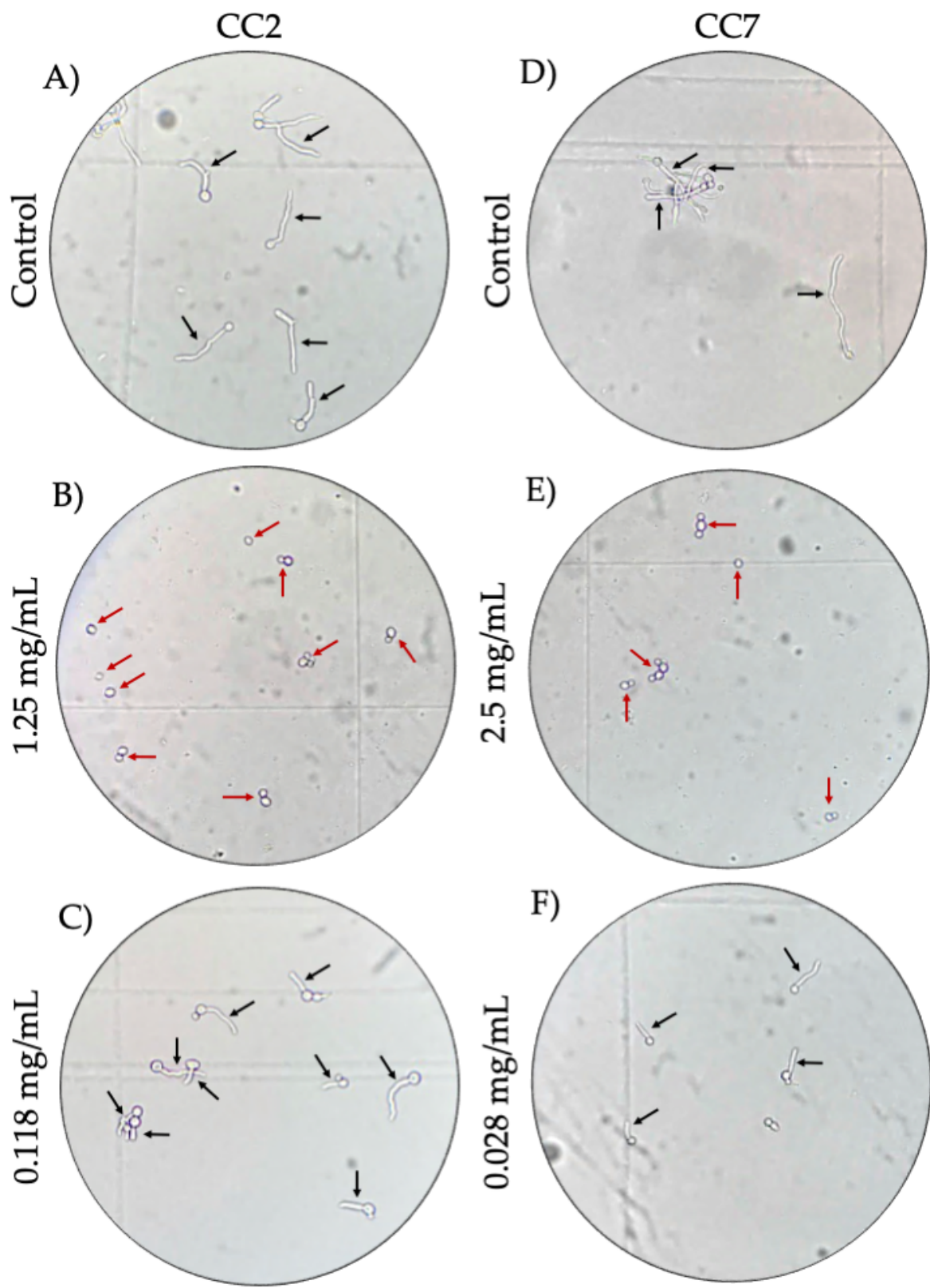


Figura 3. Microfotografías representativas (40X) del efecto inhibitorio del propóleo en el crecimiento del tubo germinativo de *C. albicans*. Las flechas negras señalan el tubo germinativo de *C. albicans*. Las flechas rojas señalan a *C. albicans* sin crecimiento del tubo germinativo. A) y D) Crecimiento del tubo germinativo de *C. albicans* del CC2 y CC7, respectivamente, después de cuatro horas de cultivo. B) Inhibición completa del tubo germinativo en el CC2 con una concentración de 1.25 mg/mL de propóleo mexicano. C) 51.54% de inhibición del crecimiento del tubo germinativo en el CC2 a 0.118 mg/mL de propóleo. E) Inhibición completa del tubo germinativo a 2.5 mg/mL en el CC7. F) 60.08% de inhibición del crecimiento del tubo germinativo en el CC7 a 0.028 mg/mL de propóleo.

8.5 Composición química del propóleo Mexicano

El análisis de RMN inicial del extracto de propóleo evidenció y confirmó la presencia de compuestos fenólicos, ya que el espectro de RMN de ^1H mostró señales de protones aromáticos en δ 6–8. Posteriormente, una porción (1 g) del extracto se separó por cromatografía en columna y se obtuvieron 189 fracciones que se analizaron por TLC, y aquellas fracciones que mostraron una composición interesante fueron analizadas por ESI-MS y RMN. Con base en este análisis, se identificaron seis compuestos, siendo estos Pinocembrina (**1**), Biochanina A (**2**), Baicaleína (**3**), Pinobanksina chalcona (**4**), 5,8-dihidroxi-flavanona (**5**) y Ramnetina (**6**). Su estructura química se muestra en la Figura 4.

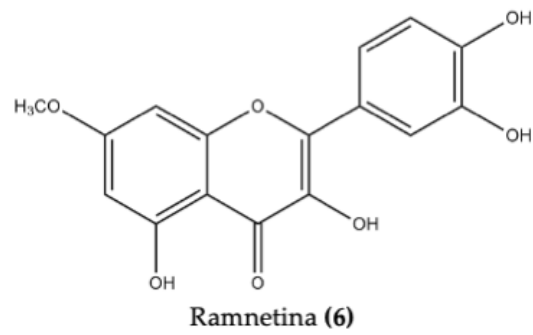
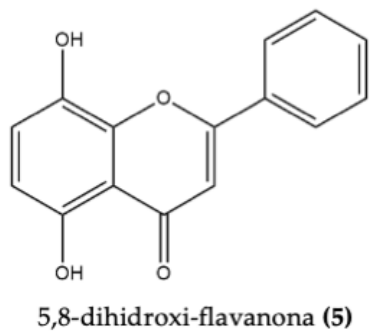
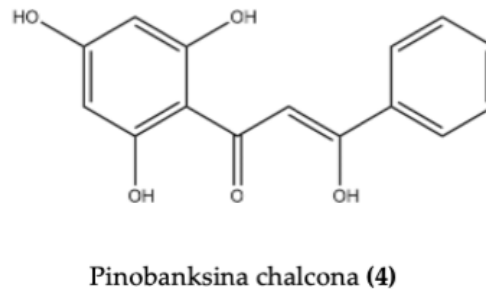
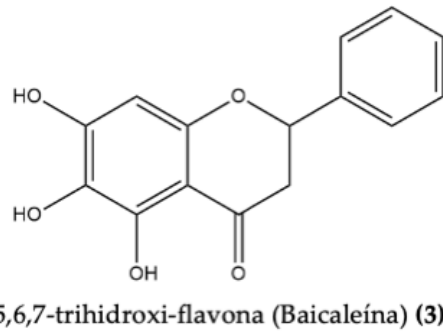
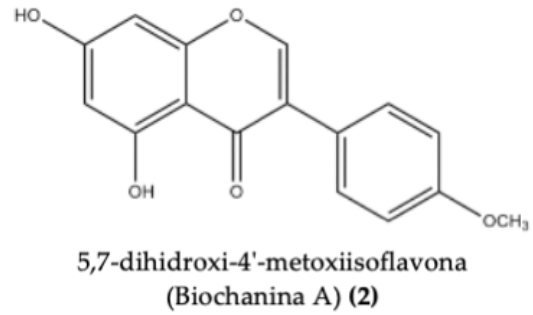
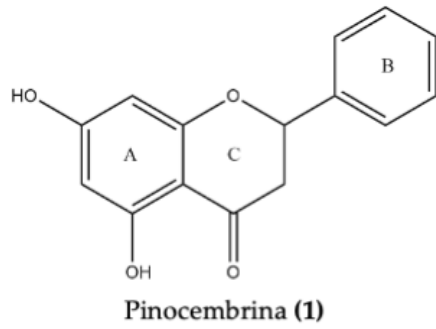


Figura 4. Estructura química de los flavonoides presentes en el propóleo mexicano.

9 DISCUSIÓN

Los productos naturales son una fuente invaluable de compuestos con diversas propiedades medicinales. Los compuestos de origen vegetal proporcionan una gran cantidad de nuevos agentes con potencial terapéutico [88, 89]. El propóleo es un producto apícola elaborado por las abejas a partir de compuestos de origen vegetal y ha demostrado ser un gran candidato para el tratamiento de diferentes afecciones de salud [90].

Diferentes estudios a nivel mundial han demostrado que, entre las propiedades biológicas del propóleo en distintas regiones del mundo, comúnmente se observan efectos antioxidantes, antiinflamatorios y antimicrobianos con este producto natural [51, 52, 64, 91, 92]. Sin embargo, estas propiedades tienden a variar según la región específica en la que se obtienen las muestras de propóleo, ya que la flora específica del entorno de las abejas es diferente en cada zona y continente del mundo [93-95].

Entre las diferentes propiedades biológicas del propóleo, destaca su actividad antifúngica. Algunos de los organismos más interesantes que están directamente relacionados con las infecciones de la cavidad oral son los hongos del género *Candida*, los cuales son comensales oportunistas que pueden producir infecciones en individuos con un estado inmunodeprimido causado por la ingesta de fármacos, o por enfermedades sistémicas como el cáncer o la diabetes. Además, el uso de algunos dispositivos en la cavidad oral, como las prótesis infectadas con *Candida* sp. utilizados en tratamientos odontológicos, pueden contribuir no solo a la infección por este hongo microscópico, sino que también pueden influir y promover el sobrecrecimiento de *Candida* sp., lo que lleva a la condición conocida clínicamente como candidiasis [96-98].

Ha habido un creciente interés en encontrar alternativas para el tratamiento de la candidiasis, debido a la creciente resistencia de *Candida* sp. a los fármacos clásicos, sin tener en cuenta los efectos secundarios asociados a los mismos [97, 99-101]. Los productos naturales presentan una opción atractiva, por su baja o nula toxicidad; además, la rica composición química del propóleos proporciona la ventaja

de que algunos de los metabolitos secundarios presentes en él podrían actuar sobre algunos factores de virulencia que presentan *Candida* sp., contribuyendo a la atenuación de la patogenicidad de estos microorganismos. Este efecto adicional tiene como objetivo inhibir la virulencia en lugar de solo el crecimiento de hongos, lo que lo que podría disminuir el desarrollo de resistencia a los medicamentos [102].

Considerando lo anterior, en un estudio, probaron los efectos fungicidas de 50 muestras de propóleo de Polonia en cinco cepas de *C. albicans* (ATCC 76615), y el valor medio de MIC de las muestras de propóleo fue inferior a 25 mg/mL para todas las cepas de *Candida* [78]; en este sentido, nuestra muestra de propóleo mexicano presentó mayor actividad fungicida en comparación con el propóleo europeo, ya que los valores de CF₅₀ fueron inferiores a 1 mg/mL, además de que los valores de CFM tanto en *C. albicans* y las otras cepas de *Candida* analizadas en nuestro trabajo (es decir, *C. krusei* y *C. glabrata*) variaron entre 1.25 y 0.312 mg/mL. Además, nuestra muestra de propóleo mexicano también mostró un mejor efecto antifúngico que el propóleo iraní probado en aislados humanos de *C. albicans* de infecciones de la cavidad oral. En este trabajo, los autores informaron que su muestra de propóleo iraní presentó un rango de concentraciones de MIC de 0.120 a 0.970 mg/mL [7]. En comparación, nuestra muestra de propóleo mostró un rango de valores de 0.014 a 0.237 mg/mL.

También se ha reportado que otros propóleos mexicanos obtenidos de diferentes estados de la República Mexicana (Veracruz, Estado de México y Puebla), presentan efectos antifúngicos contra 37 muestras de *C. albicans*. Una de estas cepas fue la ATCC 10231, que se utilizó como cepa de referencia, mientras que las otras 36 cepas se obtuvieron de aislados humanos (obtenidos de: 11 exudados orales, 11 escamas de uñas, 7 escamas de piel, 4 sangre, 1 aspirado de líquido bronquial y 1 orina). En este trabajo, la muestra de propóleo obtenida del Estado de México fue la más activa frente a las cepas de *Candida*, ya que a una concentración de 0.80 mg/mL inhibió el 94.40% de las cepas de aislados humanos de *C. albicans*, mientras que a una concentración de 0.60 mg /mL fue suficiente para inhibir la cepa de referencia. Por lo tanto, la cepa de referencia fue más susceptible a todas las

muestras de propóleos mexicanos [103, 104]. En comparación con los otros propóleos de México, nuestra muestra de propóleo fue más activa, ya que el rango medio del CF_{50} fue de 0.065 mg/mL para todas las cepas de *C. albicans* analizadas. Esta variabilidad de actividad anti-*Candida* entre propóleos de un mismo país es un punto a considerar, ya que las características climatológicas y ambientales desérticas del lugar difieren del clima templado y tropical de los tres estados mencionados anteriormente. Esto se debe a que la flora que se puede encontrar en estas zonas difiere mucho [47, 105-108], por lo que la composición química y las propiedades biológicas de los propóleos recolectados en las distintas zonas de México pueden influir en su capacidad para inhibir la crecimiento de *C. albicans*.

Entre los factores de virulencia que presenta *C. albicans* se encuentran la secreción de enzimas hidrolíticas, la formación de biopelículas y la formación de tubos germinativos, los cuales están involucrados en diversos procesos ligados a la adhesión y formación de biopelículas relacionadas con los efectos patológicos de infección por este microorganismo [109]. Por ello, en este trabajo evaluamos el efecto del propóleo en la formación del tubo germinativo. La inhibición del tubo germinativo es un factor que está directamente relacionado con el proceso de adhesión de *C. albicans* a las superficies de los organismos; además, también está relacionado con otros factores, como el pH, la temperatura, las actividades enzimáticas extracelulares y las glicoproteínas. Como tal, la adhesión se considera el primer paso en la colonización de este microorganismo, lo que lleva a la formación de una biopelícula [101]. Las biopelículas de *C. albicans* están formadas por proteínas, lípidos, ADN extracelular y carbohidratos (que contribuyen al 25 % de la matriz, donde el complejo manano-glucano es más abundante) [110]. Por lo tanto, la inhibición del tubo germinativo es un mecanismo clave que puede determinar los efectos antifúngicos que muestran algunos productos naturales, como el propóleo, sobre las especies de *Candida*.

En este sentido, investigamos el efecto inhibitorio del propóleo mexicano sobre la formación de tubos germinativos de aislados de *C. albicans*. Se observó inhibición completa del tubo germinativo en un rango de 1.25 mg/mL a 2.5 mg/mL de propóleo;

además, el rango de CI_{50} en el que el propóleo mexicano inhibe la formación del tubo germinativo osciló entre 0.019 y 1.29 mg/mL. Cabe resaltar que solo existen dos artículos en el mundo, hasta donde sabemos, que reportan la inhibición del crecimiento del tubo germinativo de *C. albicans* con propóleos de otros países. En uno de estos trabajos evaluaron el efecto antifúngico del propóleo egipcio y demostraron que, a una concentración de 0.075 $\mu\text{g/mL}$, se redujo un 35 % la formación del tubo germinativo de *C. albicans*, la cual fue aislada de la cavidad oral [101]. El otro estudio informó que un propóleo iraní tenía la capacidad de inhibir la formación del tubo germinativo de una manera dependiente de la concentración, donde el uso de $\frac{1}{4}$ de MIC lo redujo en un 22 %, mientras que el uso de $\frac{1}{2}$ MIC lo redujo en un 36.70 % [7]. La capacidad de diferentes muestras de propóleos para inhibir el crecimiento del tubo germinativo indica una gran promesa en la búsqueda de nuevos antifúngicos, ya que este proceso celular y bioquímico es el paso inicial para que *C. albicans* comience su comportamiento como patógeno, desarrollando así todos sus mecanismos de patogenicidad.

Además, con el fin de encontrar una mejor explicación de las actividades antifúngicas reportadas, se realizó un análisis de la composición química del propóleo mexicano, ya que algunos autores han sugerido que dicha información es necesaria para comprender mejor las actividades biológicas del propóleo de diferentes regiones [42]. Dentro de los componentes que se encuentran en el propóleo mexicano, observamos una alta frecuencia de compuestos de origen fenólico, como los flavonoides, que tienen diversas propiedades beneficiosas para la salud humana. Se ha demostrado que algunos flavonoides presentes en nuestra muestra tienen efectos antifúngicos, como la pinocembrina [111-115], que ha demostrado tener un efecto inhibitor sobre la formación de biopelículas de *C. albicans*, así como sobre la forma filamentosa de este microorganismo. Otro compuesto encontrado en nuestro propóleo fue la baicaleína, de la cual se ha informado que esta flavona es capaz de inhibir la formación de biopelículas en muestras de *C. albicans* de ATCC y aislados clínicos [116]. Por tanto, es probable que el efecto anti-biofilm de la baicaleína también esté directamente relacionado

con la inhibición del tubo germinativo, ya que se trata de procesos estrechamente relacionados.

Sin embargo, estos resultados solo pueden explicar una parte de los posibles mecanismos de acción involucrados en el efecto antifúngico del propóleo mexicano. Es importante considerar otros mecanismos inhibitorios relacionados con *Candida* sp., como el daño de membrana, la inhibición de la síntesis de ácido nucleico y la inhibición del metabolismo energético, así como el cambio morfológico de levadura a hifa (conocido como dimorfismo levadura-hifa) [117, 118]. En este punto, la variabilidad y complejidad en los constituyentes químicos presentes en el propóleo mexicano lo convierte en un producto con un potencial de estudio muy interesante, permitiendo que los diferentes compuestos fenólicos ejerzan sus efectos antifúngicos a través de la sinergia entre ellos, contribuyendo a los efectos inhibitorios sobre crecimiento de microorganismos ya la inhibición de factores de virulencia relacionados con la infección por *Candida* sp. [47].

Con la información obtenida en este trabajo podemos concluir que el propóleo de Chihuahua tiene actividad antifúngica sobre muestras de *Candida* sp. obtenidas de pacientes infectados con este patógeno. La actividad anti-*Candida* y la capacidad de inhibir la formación del tubo germinativo debe estar directamente relacionada con la composición química del propóleo de Chihuahua, de la que hasta el momento se han logrado identificar compuestos de naturaleza fenólica, específicamente de la familia de los flavonoides, y de los que se han reportado diversas propiedades antimicrobianas y antifúngicas. Sin embargo, aún es necesario continuar trabajando con este y otros productos apícolas, con la finalidad de aumentar y esclarecer el conocimiento sobre mecanismos fungicidas y antimicrobianos, y al mismo tiempo sentar las bases para que en un futuro puedan realizarse estudios clínicos que permitan determinar la posibilidad de proponer e implementar al propóleo mexicano como un complemento en el tratamiento de las infecciones generadas por *Candida* sp.

10 CONCLUSIONES

- El extracto etanólico de propóleo de Chihuahua tiene actividad anti-*Candida* en aislados clínicos de *Candida* sp.
- El extracto etanólico de propóleo de Chihuahua tiene la capacidad de inhibir la formación del tubo germinativo de *C. albicans*.
- En el extracto etanólico de propóleo de Chihuahua se detectaron compuestos de origen fenólico como pinocembrina, biochanina A, baicaleína, pinobanksina chalcona, 5,8-dihidroxi-flavanona y ramnetina.
- Los compuestos identificados en el extracto etanólico de propóleo de Chihuahua están directamente relacionados con la actividad anti-*Candida* y con la inhibición del tubo germinativo.

11 REFERENCIAS

1. Dadar, M., et al., *Candida albicans-Biology, molecular characterization, pathogenicity, and advances in diagnosis and control—An update*. Microbial pathogenesis, 2018. **117**: p. 128-138.
2. de Albuquerque Maranhão, F.C., et al., *Mycoses in northeastern Brazil: epidemiology and prevalence of fungal species in 8 years of retrospective analysis in Alagoas*. Brazilian Journal of Microbiology, 2019. **50**(4): p. 969-978.
3. Huang, M. and K.C. Kao, *Population dynamics and the evolution of antifungal drug resistance in Candida albicans*. FEMS microbiology letters, 2012. **333**(2): p. 85-93.
4. Sanguinetti, M., B. Posteraro, and C. Lass-Flörl, *Antifungal drug resistance among Candida species: mechanisms and clinical impact*. Mycoses, 2015. **58**: p. 2-13.
5. Gucwa, K., et al., *Antifungal activity and synergism with azoles of polish propolis*. Pathogens, 2018. **7**(2): p. 56.
6. Zabaiou, N., et al., *Biological properties of propolis extracts: Something new from an ancient product*. Chemistry and physics of lipids, 2017. **207**: p. 214-222.
7. Haghdoost, N., et al., *Antifungal activity and influence of propolis against germ tube formation as a critical virulence attribute by clinical isolates of Candida albicans*. Journal de mycologie medicale, 2016. **26**(4): p. 298-305.
8. Martínez, R.L., *Micología médica: Procedimientos para el diagnóstico de laboratorio*. 1995: Trillas.
9. Vecchiarelli, A., et al., *Specific antibody to Cryptococcus neoformans alters human leukocyte cytokine synthesis and promotes T-cell proliferation*. Infection and immunity, 1998. **66**(3): p. 1244-1247.
10. Arenas Guzmán, R. and E. Torres Guerrero, *Presentación del libro: Micología médica ilustrada*.
11. López-Martínez, R., *I. Introducción Importancia actual de la micología médica en México*. Gaceta Médica de México, 2008. **144**(2): p. 121-122.
12. Rivera, L.E.C., A.P. Ramos, and C.P. Desgarenes, *Factores de virulencia en Candida sp*. Dermatología Revista Mexicana, 2005. **49**(1): p. 12-27.
13. Staib, P., et al., *Differential activation of a Candida albicans virulence gene family during infection*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2000. **97**(11): p. 6102-6107.
14. Sturtevant, J. and R. Calderone, *Candida albicans adhesins: biochemical aspects and virulence*. Revista iberoamericana de micología, 1997. **14**: p. 90-97.
15. Marcilla, A., E. Valentín, and R. Sentandreu, *The cell wall structure: developments in diagnosis and treatment of candidiasis*. International Microbiology, 1998. **1**(2): p. 107-116.
16. Black, C.A., et al., *Acute neutropenia decreases inflammation associated with murine vaginal candidiasis but has no effect on the course of infection*. Infection and immunity, 1998. **66**(3): p. 1273-1275.
17. Fidel Jr, P.L., *History and update on host defense against vaginal candidiasis*. American journal of reproductive immunology, 2007. **57**(1): p. 2-12.
18. Panizzo, M.M., C. Pérez, and M.T. Maniscalchi, *Susceptibilidad in vitro a los antifúngicos de Candida sp. y serotipos de Candida albicans aisladas de pacientes con vaginitis primaria y resurrente*. Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología, 2000. **20**(1): p. 01-01.
19. Forsyth, C.B. and H.L. Mathews, *Lymphocyte adhesion to Candida albicans*. Infection and immunity, 2002. **70**(2): p. 517-527.
20. Nomanbhoy, F., et al., *Vaginal and oral epithelial cell anti-Candida activity*. Infection and immunity, 2002. **70**(12): p. 7081-7088.

21. Pardi, G. and E.I. Cardozo, *Algunas consideraciones sobre Candida albicans como agente etiológico de candidiasis bucal*. Acta odontol. venez, 2002: p. 9-17.
22. Steele, C. and P.L. Fidel Jr, *Cytokine and chemokine production by human oral and vaginal epithelial cells in response to Candida albicans*. Infection and immunity, 2002. **70**(2): p. 577-583.
23. Wozniak, K.L., F.L. Wormley Jr, and P.L. Fidel Jr, *Candida-specific antibodies during experimental vaginal candidiasis in mice*. Infection and immunity, 2002. **70**(10): p. 5790-5799.
24. Pontón, J. and G. Quindós, *Mecanismos de resistencia a la terapéutica antifúngica*. Medicina Clínica, 2006. **126**: p. 56-60.
25. Pittet, D., et al., *Candida colonization and subsequent infections in critically ill surgical patients*. Annals of surgery, 1994. **220**(6): p. 751.
26. Myrvik, Q.N., R.S. Weiser, and A. Folch Pi, *Bacteriología y micología médicas*. 1991.
27. Robbins, N., G.D. Wright, and L.E. Cowen, *Antifungal drugs: the current armamentarium and development of new agents*. Microbiology spectrum, 2016. **4**(5): p. 4.5. 19.
28. Cleveland, A.A., et al., *Changes in incidence and antifungal drug resistance in candidemia: results from population-based laboratory surveillance in Atlanta and Baltimore, 2008–2011*. Clinical infectious diseases, 2012. **55**(10): p. 1352-1361.
29. Diekema, D., et al., *Epidemiology of candidemia: 3-year results from the emerging infections and the epidemiology of Iowa organisms study*. Journal of Clinical Microbiology, 2002. **40**(4): p. 1298-1302.
30. Tortorano, A.M., et al., *Candidaemia in Europe: epidemiology and resistance*. International journal of antimicrobial agents, 2006. **27**(5): p. 359-366.
31. Gavaldà, J., et al., *Guidelines for the treatment of infection due to Aspergillus spp*. Enfermedades infecciosas y microbiología clínica, 2003. **21**(10): p. 571-578.
32. Rüping, M.J., J.J. Vehreschild, and O.A. Cornely, *Patients at high risk of invasive fungal infections*. Drugs, 2008. **68**(14): p. 1941-1962.
33. Lumbreras, C., M. Lizasoain, and J.M. Aguado, *Antifúngicos de uso sistémico*. Enfermedades infecciosas y microbiología clínica, 2003. **21**(7): p. 366-380.
34. Tkacz, J.S. and B. DiDomenico, *Antifungals: what's in the pipeline*. Current opinion in microbiology, 2001. **4**(5): p. 540-545.
35. Escobar, C.M. and Á. Zuluaga, *Nuevos antimicóticos y su uso en dermatología*. Medicina cutánea ibero-latino-americana, 2004. **32**(6): p. 231-242.
36. Cuenca-Estrella, M., *Antifúngicos en el tratamiento de las infecciones sistémicas: importancia del mecanismo de acción, espectro de actividad y resistencias*. 2010.
37. Odds, F.C., A.J. Brown, and N.A. Gow, *Antifungal agents: mechanisms of action*. Trends in microbiology, 2003. **11**(6): p. 272-279.
38. Popova, M.P., et al., *GC-MS profiling of diterpene compounds in Mediterranean propolis from Greece*. Journal of agricultural and food chemistry, 2010. **58**(5): p. 3167-3176.
39. He, M., et al., *Antimicrobial mechanism of flavonoids against Escherichia coli ATCC 25922 by model membrane study*. Applied Surface Science, 2014. **305**: p. 515-521.
40. Ghisalberti, E., *Propolis: a review*. Bee world, 1979. **60**(2): p. 59-84.
41. Fokt, H., et al., *How do bees prevent hive infections? The antimicrobial properties of propolis*. Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology, 2010. **1**: p. 481-493.
42. Bankova, V., *Chemical diversity of propolis and the problem of standardization*. Journal of ethnopharmacology, 2005. **100**(1-2): p. 114-117.

43. Siheri, W., et al., *The chemical and biological properties of propolis*, in *Bee products-chemical and biological properties*. 2017, Springer. p. 137-178.
44. Burdock, G., *Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis)*. Food and Chemical toxicology, 1998. **36**(4): p. 347-363.
45. Sforcin, J.M., *Biological properties and therapeutic applications of propolis*. Phytotherapy research, 2016. **30**(6): p. 894-905.
46. Kuropatnicki, A.K., E. Szliszka, and W. Krol, *Historical aspects of propolis research in modern times*. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2013. **2013**.
47. Kujumgiev, A., et al., *Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin*. Journal of ethnopharmacology, 1999. **64**(3): p. 235-240.
48. Silva, J.C., et al., *Antimicrobial activity, phenolic profile and role in the inflammation of propolis*. Food and Chemical Toxicology, 2012. **50**(5): p. 1790-1795.
49. Moreira, L., et al., *Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal*. Food and Chemical toxicology, 2008. **46**(11): p. 3482-3485.
50. Kocot, J., et al., *Antioxidant potential of propolis, bee pollen, and royal jelly: possible medical application*. Oxidative medicine and cellular longevity, 2018. **2018**.
51. Hu, F., et al., *Effects of ethanol and water extracts of propolis (bee glue) on acute inflammatory animal models*. Journal of ethnopharmacology, 2005. **100**(3): p. 276-283.
52. Bueno-Silva, B., et al., *Brazilian red propolis attenuates inflammatory signaling cascade in LPS-activated macrophages*. PLoS One, 2015. **10**(12): p. e0144954.
53. Chan, G.C.-F., K.-W. Cheung, and D.M.-Y. Sze, *The immunomodulatory and anticancer properties of propolis*. Clinical reviews in allergy & immunology, 2013. **44**(3): p. 262-273.
54. Al-Hariri, M., *Immune's-boosting agent: Immunomodulation potentials of propolis*. Journal of family & community medicine, 2019. **26**(1): p. 57.
55. Sforcin, J.M. and V. Bankova, *Propolis: is there a potential for the development of new drugs?* Journal of ethnopharmacology, 2011. **133**(2): p. 253-260.
56. Bankova, V.S., S.L. de Castro, and M.C. Marcucci, *Propolis: recent advances in chemistry and plant origin*. Apidologie, 2000. **31**(1): p. 3-15.
57. Huang, S., et al., *Recent advances in the chemical composition of propolis*. Molecules, 2014. **19**(12): p. 19610-19632.
58. Lotfy, M., *Biological activity of bee propolis in health and disease*. Asian Pac J Cancer Prev, 2006. **7**(1): p. 22-31.
59. Kurek-Górecka, A., et al., *Structure and antioxidant activity of polyphenols derived from propolis*. Molecules, 2014. **19**(1): p. 78-101.
60. Bankova, V., *Recent trends and important developments in propolis research*. Evidence-based complementary and alternative medicine, 2005. **2**(1): p. 29-32.
61. Falcão, S.I., et al., *Phenolic characterization of Northeast Portuguese propolis: usual and unusual compounds*. Analytical and bioanalytical chemistry, 2010. **396**(2): p. 887-897.
62. An, S.-H., et al., *Antimicrobial Activities of Propolis in Poloxamer Based Topical Gels*. Pharmaceutics, 2021. **13**(12): p. 2021.
63. Meto, A., et al., *Propolis affects Pseudomonas aeruginosa growth, biofilm formation, eDNA release and phenazine production: Potential involvement of polyphenols*. Microorganisms, 2020. **8**(2): p. 243.
64. Przybyłek, I. and T.M. Karpiński, *Antibacterial properties of propolis*. Molecules, 2019. **24**(11): p. 2047.
65. Cerqueira, P., A. Cunha, and C. Almeida-Aguiar, *Potential of propolis antifungal activity for clinical applications*. Journal of Applied Microbiology.

66. Fernández-Calderón, M.C., et al., *Antifungal and anti-biofilm activity of a new Spanish extract of propolis against Candida glabrata*. BMC Complementary Medicine and Therapies, 2021. **21**(1): p. 1-10.
67. Magnavacca, A., et al., *The antiviral and immunomodulatory activities of propolis: An update and future perspectives for respiratory diseases*. Medicinal Research Reviews, 2022. **42**(2): p. 897-945.
68. Shimizu, T., et al., *Anti-influenza virus activity of propolis in vitro and its efficacy against influenza infection in mice*. Antiviral Chemistry and Chemotherapy, 2008. **19**(1): p. 7-13.
69. Zulhendri, F., et al., *Antiviral, antibacterial, antifungal, and antiparasitic properties of propolis: A Review*. Foods, 2021. **10**(6): p. 1360.
70. de L. Paula, L.A., et al., *Antiparasitic properties of propolis extracts and their compounds*. Chemistry & Biodiversity, 2021. **18**(9): p. e2100310.
71. Zaccaria, V., et al., *Effect of green and brown propolis extracts on the expression levels of microRNAs, mRNAs and proteins, related to oxidative stress and inflammation*. Nutrients, 2017. **9**(10): p. 1090.
72. El-Seedi, H.R., et al., *Honey Bee Products: Preclinical and Clinical Studies of Their Anti-inflammatory and Immunomodulatory Properties*. Frontiers in Nutrition, 2022. **8**: p. 761267.
73. Forma, E. and M. Bryś, *Anticancer activity of propolis and its compounds*. Nutrients, 2021. **13**(8): p. 2594.
74. Elumalai, P., et al., *An Insight into Anticancer Effect of Propolis and Its Constituents: A Review of Molecular Mechanisms*. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2022. **2022**.
75. Rivera-Yañez, N., et al., *Biomedical properties of propolis on diverse chronic diseases and its potential applications and health benefits*. Nutrients, 2020. **13**(1): p. 78.
76. Kitamura, H., *Effects of propolis extract and propolis-derived compounds on obesity and diabetes: Knowledge from cellular and animal models*. Molecules, 2019. **24**(23): p. 4394.
77. Búfalo, M.C., et al., *The immunomodulatory effect of propolis on receptors expression, cytokine production and fungicidal activity of human monocytes*. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2014. **66**(10): p. 1497-1504.
78. Stähli, A., et al., *In vitro activity of propolis on oral microorganisms and biofilms*. Antibiotics, 2021. **10**(9): p. 1045.
79. Sokolonski, A.R., et al., *Activity of antifungal drugs and Brazilian red and green propolis extracted with different methodologies against oral isolates of Candida spp.* BMC complementary medicine and therapies, 2021. **21**(1): p. 1-14.
80. Nani, B.D., et al., *Anti-inflammatory and anti-Candida effects of Brazilian organic propolis, a promising source of bioactive molecules and functional food*. Journal of agricultural and food chemistry, 2019. **68**(10): p. 2861-2871.
81. Freires, I.A., et al., *Chemical composition and antifungal potential of Brazilian propolis against Candida spp.* Journal de mycologie medicale, 2016. **26**(2): p. 122-132.
82. Martins, M.-L. and Y.-W. Cavalcanti, *Red propolis hydroalcoholic extract inhibits the formation of Candida albicans biofilms on denture surface*. Journal of clinical and experimental dentistry, 2020. **12**(7): p. e626.
83. Gavanji, S. and B. Larki, *Comparative effect of propolis of honey bee and some herbal extracts on Candida albicans*. Chinese journal of integrative medicine, 2017. **23**(3): p. 201-207.
84. Al-Ani, I., et al., *Antimicrobial activities of European propolis collected from various geographic origins alone and in combination with antibiotics*. Medicines, 2018. **5**(1): p. 2.

85. Boisard, S., et al., *Antifungal and antibacterial metabolites from a French poplar type propolis*. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2015. **2015**.
86. Szwedra, P., et al., *Essential oils, silver nanoparticles and propolis as alternative agents against fluconazole resistant Candida albicans, Candida glabrata and Candida krusei clinical isolates*. Indian journal of microbiology, 2015. **55**(2): p. 175-183.
87. Cui, J., et al., *Extraction, purification, structural character and biological properties of propolis flavonoids: A review*. Fitoterapia, 2021: p. 105106.
88. Amedei, A. and M. M D'Elios, *New therapeutic approaches by using microorganism-derived compounds*. Current medicinal chemistry, 2012. **19**(22): p. 3822-3840.
89. Habbu, P., et al., *Antimicrobial metabolites from marine microorganisms*. Chinese journal of natural medicines, 2016. **14**(2): p. 101-116.
90. Toreti, V.C., et al., *Recent progress of propolis for its biological and chemical compositions and its botanical origin*. Evidence-based complementary and alternative medicine, 2013. **2013**.
91. Martinello, M. and F. Mutinelli, *Antioxidant activity in bee products: A review*. Antioxidants, 2021. **10**(1): p. 71.
92. Rivera-Yañez, N., et al., *Effects of propolis on infectious diseases of medical relevance*. Biology, 2021. **10**(5): p. 428.
93. Santos, L.M., et al., *Propolis: types, composition, biological activities, and veterinary product patent prospecting*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2020. **100**(4): p. 1369-1382.
94. Ristivojević, P., et al., *Poplar-type propolis: Chemical composition, botanical origin and biological activity*. Natural product communications, 2015. **10**(11): p. 1934578X1501001117.
95. Salatino, A., et al., *Propolis research and the chemistry of plant products*. Natural product reports, 2011. **28**(5): p. 925-936.
96. Lombardi, A. and A. Ouanounou, *Fungal infections in dentistry: Clinical presentations, diagnosis, and treatment alternatives*. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology, 2020. **130**(5): p. 533-546.
97. Matsumoto, H., et al., *Evaluation of pathogenicity of Candida albicans in germination-ready states using a silkworm infection model*. Medical mycology journal, 2013. **54**(2): p. 131-140.
98. Mayer, K., et al., *Danger map for the Bavarian Alps*. Zeitschrift der Deutschen Gesellschaft für Geowissenschaften, 2010: p. 119-128.
99. Sayyadi, F., et al., *The effect of aqueous and ethanolic extract of Iranian propolis on Candida Albicans isolated from the mouth of patients with colorectal malignancy undergone chemotherapy: An in-vitro study*. Caspian journal of internal medicine, 2020. **11**(1): p. 62.
100. Villar, C., H. Kashleva, and A. Dongari-Bagtzoglou, *Role of Candida albicans polymorphism in interactions with oral epithelial cells*. Oral microbiology and immunology, 2004. **19**(4): p. 262-269.
101. Gomaa, O.M. and A.S. Gaweesh, *Variation in adhesion and germ tube formation of oral Candida using Egyptian propolis*. Canadian journal of microbiology, 2013. **59**(3): p. 197-203.
102. Khan, M.S., et al., *Sub-MICs of Carum copticum and Thymus vulgaris influence virulence factors and biofilm formation in Candida spp*. BMC complementary and alternative medicine, 2014. **14**(1): p. 1-14.
103. M., G.P.J.a.P.R.J., *Advances in Chemical Composition and Biological Activity of Mexican Propolis*. LOJ Pharmacology and Clinical Research 2020. **2**(3): p. 194-201.

104. Quintero-Mora, M.L., et al., *Efecto de extractos de propóleos mexicanos de Apis mellifera sobre el crecimiento in vitro de Candida albicans*. Revista Iberoamericana de Micología, 2008. **25**(1): p. 22-26.
105. Neto, M.R., et al., *Seasonal variation of Brazilian red propolis: Antibacterial activity, synergistic effect and phytochemical screening*. Food and Chemical Toxicology, 2017. **107**: p. 572-580.
106. Sforcin, J., et al., *Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity*. Journal of ethnopharmacology, 2000. **73**(1-2): p. 243-249.
107. Kosalec, I., et al., *Flavonoid analysis and antimicrobial activity of commercially available propolis products*. Acta Pharmaceutica, 2005. **55**(4): p. 423-430.
108. Bankova, V., et al., *Chemical composition of European propolis: expected and unexpected results*. Zeitschrift für Naturforschung C, 2002. **57**(5-6): p. 530-533.
109. D'Auria, F.D., et al., *Antifungal Activity of the Frog Skin Peptide Temporin G and Its Effect on Candida albicans Virulence Factors*. International Journal of Molecular Sciences, 2022. **23**(11): p. 6345.
110. Zarnowski, R., et al., *Novel entries in a fungal biofilm matrix encyclopedia*. MBio, 2014. **5**(4): p. e01333-14.
111. López, A., D.S. Ming, and G.N. Towers, *Antifungal Activity of Benzoic Acid Derivatives from Piper l anceaeifolium*. Journal of Natural Products, 2002. **65**(1): p. 62-64.
112. Hegazi, A.G., F.K. Abd El Hady, and F.A. Abd Allah, *Chemical composition and antimicrobial activity of European propolis*. Zeitschrift für Naturforschung C, 2000. **55**(1-2): p. 70-75.
113. Metzner, J. and E. Schneidewind, *Effect of pinocembrin on the course of experimental candida infections in mice*. Mykosen, 1978. **21**(8): p. 257-262.
114. Kanchanapiboon, J., et al., *Boesenbergia rotunda extract inhibits Candida albicans biofilm formation by pinostrobin and pinocembrin*. Journal of Ethnopharmacology, 2020. **261**: p. 113193.
115. Singh, B. and R. A Sharma, *Anti-inflammatory and antimicrobial properties of flavonoids from Heliotropium subulatum exudate*. Inflammation & Allergy-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Inflammation & Allergy)(Discontinued), 2015. **14**(2): p. 125-132.
116. Shirley, K.P., et al., *In vitro effects of Plantago major extract, aucubin, and baicalein on Candida albicans biofilm formation, metabolic activity, and cell surface hydrophobicity*. Journal of Prosthodontics, 2017. **26**(6): p. 508-515.
117. Cushnie, T.T. and A.J. Lamb, *Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids*. International journal of antimicrobial agents, 2011. **38**(2): p. 99-107.
118. Gabriela, N., et al., *The effect of Zuccagnia punctata, an argentine medicinal plant, on virulence factors from Candida species*. Natural Product Communications, 2014. **9**(7): p. 1934578X1400900712.

