



## Evaluación *in vitro* de la actividad antimicrobiana de un propóleo chileno sobre muestras clínicas de exudados bucofaríngeos y cepas ATCC

[*In vitro* evaluation of the antimicrobial activity of a Chilean propolis on clinical samples of oropharyngeal exudates]

Natalia Balboa<sup>1</sup>, Daniela Núñez<sup>2</sup>, Marysol Alvear<sup>1</sup>, Anabelle Cerón<sup>3</sup> y Marco Paredes<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Depto. de Ciencias Químicas y Recursos Naturales, Facultad de Ingeniería y Ciencias, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile

<sup>2</sup>Depto. de Ciencias Básicas, Facultad de Medicina, Universidad de La Frontera, Temuco, Chile

<sup>3</sup>Facultad de Ciencias Químicas, Universidad La Salle, México

Contactos / Contacts: Marco PAREDES - E-mail address: [marco.paredes@ufrontera.cl](mailto:marco.paredes@ufrontera.cl)

**Abstract:** Propolis is a substance manufactured by *Apis mellifera* and has been widely used in folk medicine due to its high concentration of bioactive compounds. The purpose of the following study was to characterize and evaluate *in vitro* the antimicrobial properties of propolis on clinical samples and ATCC strains. The chemical characterization of propolis presents a concentration of total polyphenols of  $247 \pm 9$  mg EAG g<sup>-1</sup> MS, flavones and flavonols  $75 \pm 4$  mg EQ g<sup>-1</sup> MS, flavanonones and flavanonols  $118 \pm 11$  EP g<sup>-1</sup> MS. HPLC-DAD identified apigenin, galangin, phenethyl ester of caffeic acid and pinocembrin, in addition to 16 compounds by HPLC MS/MS. Chilean propolis is a natural antimicrobial, showing effectiveness in strains ATCC *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Trichophyton rubrum* and clinical samples of *Staphylococcus aureus* unlike *Escherichia coli*. These results demonstrate the antimicrobial effectiveness of the synergy of compounds present in propolis against different human pathogens.

**Keywords:** Flavonoids; *E. coli*; *S. aureus*; *C. albicans*; *T. rubrum*.

**Resumen:** El propóleo es una sustancia fabricada por *Apis mellifera* y ha sido utilizado ampliamente en la medicina popular debido a su alta concentración de compuestos bioactivos. El propósito del siguiente estudio fue caracterizar y evaluar *in vitro* las propiedades antimicrobianas del propóleo sobre muestras clínicas y cepas ATCC. La caracterización química de propóleos presenta una concentración de polifenoles totales de  $247 \pm 9$  mg EAG g<sup>-1</sup> de MS, flavonas y flavonoles  $75 \pm 4$  mg EQ g<sup>-1</sup> de MS, flavanononas y flavanonoles  $118 \pm 11$  EP g<sup>-1</sup> de MS. Mediante HPLC-DAD se identificó apigenina, galangina, fenetil éster del ácido cafeico y pinocembrina, además de 16 compuestos mediante HPLC MS/MS. El propóleo chileno es un antimicrobiano natural, observándose efectividad en cepas ATCC *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Trichophyton rubrum* y muestras clínicas de *Staphylococcus aureus* a diferencia de *Escherichia coli*. Estos resultados demuestran la efectividad antimicrobiana de la sinergia de compuestos presentes en el propóleo ante diferentes patógenos humanos.

**Palabras clave:** Flavonoides; *E. coli*; *S. aureus*; *C. albicans*; *T. rubrum*

Recibido | Received: 29 de Mayo de 2018

Aceptado | Accepted: 14 de Agosto de 2018

Aceptado en versión corregida | Accepted in revised form: 23 de Octubre de 2018

Publicado en línea | Published online: 30 de Noviembre de 2018

Declaración de intereses | Declaration of interests: Becas CONICYT de doctorado nacional y de pasantía en el extranjero 21140816 y 21120557, llevada a cabo en la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de la Salle, México.

Este artículo puede ser citado como / This article must be cited as: N Balboa, D Núñez, M Alvear, A Cerón, M Paredes. 2018. Evaluación *in vitro* de la actividad antimicrobiana de un propóleo chileno sobre muestras clínicas de exudados bucofaríngeos y cepas ATCC. *Bol Latinoam Caribe Plant Med Aromat* 17 (6): 541 – 554.

## INTRODUCCIÓN

Durante los últimos años diversos microorganismos han desarrollado resistencia a diferentes drogas utilizadas para su control. Dentro de estos se destaca la alta resistencia presentada por el bacilo Gram negativo *Escherichia coli* (*E. coli*) y la cocácea Gram positivo *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) a los antibióticos, siendo los principales causantes de enfermedades intrahospitalarias (Cabrera et al., 2007). *E. coli* presenta frecuentemente resistencia a los antimicrobianos de primera línea como la fosfomicina, nitrofurantoína, cefixima, profloxacino, entre otros (Andreu et al., 2008). *S. aureus* presenta resistencia a la metilina siendo esta de alrededor de un 50 a 85% de los aislados diseminados por todo el mundo, evidenciándose además en México resistencia a eritromicina, clindamicina, trimetoprim/sulfametoxazol, gentamicina y ciprofloxacina (Gil, 2000). Asimismo se ha estudiado la eficacia de los antimicóticos y la resistencia asociada a ellos, siendo el género *Candida* el principal causante de las enfermedades causadas por micosis, destacándose *Candida albicans* como el principal agente causante de esta problemática. En México se ha destacado como una problemática emergente, pudiéndose observar a pacientes con micosis superficiales o sistémicas en los centros hospitalarios, los cuales no han respondido al tratamiento convencional y volviéndose de este modo algunas cepas resistentes o multirresistentes a los antifúngicos (Manzano-Gayosso et al., 2008). Dentro de los mecanismos de resistencia a antimicóticos se postula una alteración en el proceso de penetración de los compuestos antimicóticos, el cual es provocado por los genes CDR1 y CDR2, además de la modificación de la molécula blanco asociadas al gen ERG11, entre otros (Ortigoza-Medrano y Arroyo-Espinoza, 2014). El dermatofito *T. rubrum* es el principal causante de enfermedades de la piel, siendo el principal problema el desarrollo de la onicomicosis. Además se ha determinado la resistencia a los compuestos azólicos tales como ketoconazol, itraconazol o fluconazol (Méndez-Tovar et al., 2007). Debido a la alta resistencia de los patógenos frente a los diversos tratamientos con antibióticos sintéticos utilizados en la actualidad, se están buscando diversos tratamientos de origen natural y amigables para el medio ambiente (Ponce y Millones, 2015; Bolado-Martínez et al., 2018).

El propóleo es una sustancia de composición compleja y aspecto resinoso, fabricado por la abeja *Apis mellifera* L. a partir de la vegetación adyacente a

la colmena (Peña, 2008). Las abejas colectan diferentes componentes de la flora circundante, como exudados de vegetales, los cuales son fabricados por las plantas en tejidos dañados como medida de protección, siendo estas resinas, lacas, gomas y aceites (Gardana et al., 2007). Estos componentes, juntos con el polen son mezclados con secreciones provenientes de sus glándulas salivales, lo que le brinda características únicas dependiendo de la zona geográfica donde sea colectado (Toreti et al., 2013). Etimológicamente el término proviene del griego *Propolis* “defensa de la ciudad” o “colmena”, haciendo alusión al papel protector del propóleo, donde las abejas lo utilizan para sellar las colmenas e impedir el ingreso de agua y agentes invasores tales como bacterias, hongos y ácaros previniendo además el ingreso de microorganismos (Farré et al., 2004; Palomino et al., 2009).

Diversos factores influyen en la composición química de propóleos, desde las barreras geográficas, la flora y el sector donde sea colectado, lo que confiere además de una coloración característica a cada uno de ellos, destacándose propóleos verdes, rojos, negros y amarillos. Es así, que se han logrado identificar cerca de 300 compuestos químicos entre polifenoles, flavonoides, ácidos fenólicos, entre otros. Sin embargo, el propóleo está conformado en su gran mayoría por ceras, las cuales proveen la característica y aspecto resinoso. Gracias a la compleja composición química del propóleo, este posee diversas propiedades biológicas y farmacológicas, como actividad inmunomoduladora, antibacteriana, antifúngica, antiviral, antitumoral, antiinflamatorias, antioxidante, antiparasitaria, entre otras, siendo de gran interés en la industria farmacéutica (Stepanović et al., 2003; Sforzin, 2007; Peña, 2008). Se destaca dentro de estas propiedades, su actividad antimicrobiana y su uso como terapia tradicional sobre diversos patógenos, encontrando en los últimos años diversos estudios que han demostrado la actividad bacteriostática y bactericida, atribuyendo estas características principalmente a la presencia de polifenoles (Valenzuela et al., 2015). Actualmente, el propóleo es ampliamente utilizado en la medicina homeopática, para el tratamiento de infecciones de las vías aéreas superiores, a pesar de su uso aun son escasos los estudios clínicos que permiten evaluar su efectividad frente a diversos patógenos en humanos.

Debido a lo mencionado previamente es que se propone la utilización del propóleo como agente antimicrobiano de origen natural para el tratamiento

complementario ante el desarrollo de patologías producidas por microorganismos de diferente índole y evitar así el uso excesivo de antimicrobianos de origen sintético.

Siendo el objetivo de este estudio evaluar la actividad antimicrobiana de un propóleo chileno sobre aislados ATCC de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Candida albicans* (*C. albicans*), *Escherichia coli* (*E. coli*) y *Trichophyton rubrum* (*T. rubrum*), además de muestras clínicas bucofaríngeas de *S. aureus*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Muestra de propóleos*

Para este estudio se utilizó una muestra de un propóleo chileno proveniente de Región del Bio-bío, Chile (GPS -37° 41.37 S, -72° 11.03 O). Se utilizaron 15 g de propóleos crudo (no comercial), los cuales fueron resuspendidos en 50 mL de etanol absoluto y macerado durante 7 días. Posteriormente el propóleo se mantuvo durante un día a -20°C, para favorecer la precipitación de ceras y su consiguiente filtrado con papel Whatman N°1. La muestra fue concentrada a presión reducida y se redisolvió en dimetilsulfóxido (DMSO) para los posteriores análisis microbiológicos (Núñez et al., 2018).

### *Análisis botánico del propóleos*

La identificación botánica de las especies vegetales que forman parte de la conformación química del propóleo fue realizada por la bióloga Gloria Montenegro Rizzardini, académica de Botánica de flora nativa de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Esta identificación se llevó a cabo utilizando la metodología palinológica, mediante la identificación de tricomas glandulares y la presencia de granos de polen en la muestra. Estos hallazgos fueron cotejados con la palinoteca y base de datos de la propiedad del laboratorio de esa casa de estudios.

### *Contenido de polifenoles totales*

La determinación de la concentración de polifenoles totales se realizó utilizando la metodología de Folin-Ciocalteu, modificada de Lillo et al., (2016) Se utilizaron 10 µL (dilución 1:50) de extracto de propóleos, 400 µL de agua destilada, 80 µL de Folin-Ciocalteu y 200 µL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> al 20% obteniéndose un volumen final de 1 mL. El contenido de los tubos Eppendorf fue mezclado vigorosamente y mantenido durante 2 horas a temperatura ambiente en ausencia de luz hasta que la reacción se torne azul. La reacción colorimétrica fue leída en espectrofotómetro a 765 nm. Las concentraciones fueron calculadas en base a

una curva de calibración con ácido gálico de 0 a 1000 mg/ L y fueron expresadas en mg EAG g<sup>-1</sup> de MS. Los valores se presentan como la media de los análisis realizados por triplicado ± desviación estándar (DE).

### *Contenido de flavonas y flavonoles*

Se determinaron por el método colorimétrico descrito por Lillo et al. (2016). Para este análisis se realizó la reacción colorimétrica basada en el método de tricloruro de aluminio (AlCl<sub>3</sub>) 10 µL de la dilución apropiada del extracto de propóleos y se agregaron 20 µL de AlCl<sub>3</sub> (5%) y 970 µL de metanol absoluto (grado analítico, Merck), con un volumen total de la reacción de 1000 µL. La reacción se dejó reposar 30 minutos en oscuridad y se leyó la absorbancia a 425 nm. Los valores de absorbancia se interpolaron en una curva de calibración de quercetina de 0 a 1000 mg/L. El contenido de flavonas y flavonoles se expresa como mg EQ g<sup>-1</sup> de MS. Los valores se presentan como la media de los análisis realizados por triplicado ± desviación estándar (DE).

### *Contenido de flavanonas y dihidroflavonoles*

Fueron determinadas mediante el método colorimétrico descrito por Chang et al. (2002), utilizando la reacción con 2,4 dinitrofenilhidrazina (2,4-DNFH). Para realizar la determinación, se utilizaron 250 µL de la dilución apropiada del extracto de propóleos, 500 µL de 2,4-DNFH, se incubó por 50 min a 50 °C, se enfrió a temperatura ambiente y luego se agregó 1,75 mL de KOH (5% en metanol). Se tomaron 500 µL de la reacción y se diluyeron hasta 5 mL con metanol. La absorbancia fue leída en espectrofotómetro a 486 nm. Los valores de absorbancia se interpolaron en una curva de calibración de pinocembrina de 0 a 1000 mg/ L. El contenido de flavanonas y flavanonoles se expresa en mg EP g<sup>-1</sup> de MS. Los valores se presentan como la media de los análisis realizados por triplicado ± desviación estándar (DE).

### *Caracterización mediante HPLC ESI MS/MS*

El extracto etanólico de propóleos fue analizada mediante HPLC/UV- ESI MS/MS con las siguientes características: Un Cromatógrafo líquido Shimadzu Prominence LC-20AD con detector UV/VIS acoplado Espectrómetro de Masas Applied Biosystems/MDS Sciex 3200 Qtrap equipado con fuente de Ionización por Electrospray Turbo VTM. La separación cromatográfica se realizó en columna RP- C18 Inertsil ODS-3 (2,1 x 150 mm, 3µm), usando un volumen de inyección de 10 µL, un flujo

de 0,2 mL min<sup>-1</sup> y temperatura de columna de 35° C. La muestra fue separada utilizando un gradiente de concentraciones de fase móvil A (Ácido Fórmico 0,1% (Agua)) y fase móvil B (Ácido Fórmico 0,1% (Metanol)). La longitud de onda de trabajo del detector UV/VIS fue de 360 nm. El control del HPLC y espectrómetro se realizó por medio del software Analyst 1.5.1.

### **Caracterización mediante HPLC/DAD**

Para la determinación de los compuestos presentes en las muestras de propóleos se utilizó cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). El equipo utilizado es HPLC system (Shimadzu) el cual está equipado con una bomba (modelo LC-20 AT), un detector UV-visible (SPD-M20A) y un calefactor (Modelo CTO-20AC). La separación de los compuestos se realizó mediante la utilización de la columna RP-18 (250 x 4,6 mm, tamaño de partícula 5 µm) (Merck, Germany) a 25° C con una mezcla de 0.5% de ácido fórmico en agua (A) y metanol (B) como fase móvil. Se utilizó una corrida isocrática 0-10 min con la mezcla 70% A y 30% B, seguido de un gradiente 100% B por 70 min. Los compuestos fueron determinados a 290 nm con 0,001 de sensibilidad, el volumen de inyección fue 10 µL a una concentración de 500 ppm.

### **Análisis microbiológico**

#### **Microorganismos**

Los microorganismos utilizados en este estudio corresponden a cepas ATCC adquiridas por la Universidad de La Salle, México, y que se encuentran en el cepario de la Universidad, *Staphylococcus aureus* (ATCC® 33862™), *Candida albicans* (ATCC® 60193™), *Escherichia coli* (ATCC® 10536™), *Trichophyton rubrum* (ATCC® MYA-4438™), además de exudados buco faríngeos de *S. aureus*, obtenidos a partir de muestras clínicas.

#### **Macrodilución**

Se utilizaron los protocolos descritos por el instituto de normas clínicas y de laboratorio (CLSI, 2017a; CLSI, 2017b) para los análisis de macrodilución en caldo. Se ajustó la concentración de los microorganismos a la escala 0,5 de Mc Farland (1-5 x 10<sup>5</sup> CFU/mL). La solución Stock resuspendida en DMSO fue diluida de forma serial y se agregó al medio de cultivo para obtener concentraciones finales de 1000, 1500, 2000, 2500 y 3000 µg/ mL de propóleos para la determinación de la concentración mínima inhibitoria y la mejor actividad del extracto sobre *S. aureus*, *C. albicans* y *E.coli*. Además, 30

exudados bucofaríngeos de voluntarios fueron utilizadas para este estudio, una vez aislados los microorganismos se realizó la confirmación de la cepa mediante la utilización de pruebas bioquímicas, manitol salado, coagulasa y catalasa, además de pruebas de Gram para la determinación de las características morfológicas. Los aislados que dieron coagulasa y catalasa positivo fueron catalogados como *S. aureus*, siendo estos un total de 10 aislados. Luego de la macrodilución se realizó la resiembra de cada uno de los tratamientos con propóleos en medio Mueller Hinton para confirmar la actividad antimicrobiana del propóleos.

#### **Método de difusión en agar**

La prueba de susceptibilidad antifúngica contra la cepa ATCC *T. rubrum* se realizó mediante la utilización de medio de cultivo agar sabouraud dextrosa (ASD). La solución Stock resuspendida en DMSO fue diluida de forma serial y se agregó al medio de cultivo para obtener concentraciones finales de 1000, 2000, 3000, y 4000 µg/ mL de extracto de propóleos. Posteriormente se realizó la inoculación del hongo mediante picadura a cada una de las concentraciones evaluadas y luego de 8 días de incubación a 28° C del hongo *T. rubrum* se procedió a evaluar el crecimiento versus el control sin tratamiento.

#### **Prueba de sensibilidad a antibiótico**

Se evaluó la resistencia a antibióticos de las cepas estudiadas, mediante el uso de sensidiscos (BIO RAD). Para esto, se realizó la siembra de las bacterias, ajustando previamente su concentración en el medio de cultivo caldo Mueller Hinton a pH 7,2 a 7,4, luego de un crecimiento de 3 horas a una concentración 0,5 de Mc Farland con solución salina. Para la inoculación del agar se utilizó un hisopo estéril de algodón, el cual se humedeció con la suspensión bacteriana y se quitó el exceso de caldo presionando en la pared interna del tubo. Posteriormente se estría la placa en la totalidad de la superficie del agar en tres direcciones y luego que el inóculo se ha secado (3-5 minutos) se procede a colocar los multidiscos. Los antibióticos utilizados en este estudio corresponden a ampicilina (AM), Cefepime (FEP), Cefalotina (CF), Cefotaxima (CTX), Gentamicina (GE), Levofloxacina (LEV), trimetoprim- sulfametoxazol (STX).

#### **Análisis estadístico**

La caracterización química mediante colorimetría fue realizada por triplicado y se reportan como el

promedio  $\pm$  la desviación estándar (DS). Se utilizó el programa Prisma® para el análisis.

## RESULTADOS

### Caracterización botánica

La evaluación del origen botánico del propóleo se realizó a partir del análisis del polen y tricomas glandulares presentes en la muestra. Los compuestos químicos del propóleo se originan principalmente de exudados vegetativos producidos por los órganos de las plantas tales como hojas y tallos nuevos, además de sustancias secretadas por el metabolismo de la abeja. A partir de esto se realizó el análisis de los restos vegetales presentes en la muestra de propóleo crudo, el cual determinó la dominancia de estructuras vegetales nativas características de un bosque templado y del bosque de Araucaria. Siendo la especie más abundante *Araucaria Araucana* y en segundo lugar elementos estructurales de *Escallonia rubra* la cual presenta tricomas glandulares y filamentosos característicos de sus hojas. En menor concentración se evidenció la presencia de la especie vegetal *Baccharis rhomboidalis* la cual fue

reconocida por sus estomas ubicados en depresiones de las células epidérmicas y rodeados por tricomas muy característicos en forma de cabezuela glandular, siendo esta una especie ruderal que crece a los costados de los caminos.

En la fracción polínica destaca la dominancia del polen de la especie *Lotus uliginosus*, esta especie vegetal es una especie introducida y altamente melífera formando alrededor del 55% del polen presente en esta muestra de propóleo. Con un 22% del polen presente en la muestra se encontró a la especie *Baccharis rhomboidalis* y en menor concentración las especies *Eucalyptus* spp. y *Populus* sp.

### Caracterización química del Propóleo

El propóleo chileno utilizado en este estudio mostró una alta concentración de polifenoles totales siendo estos de una concentración de 247 mg EAG g<sup>-1</sup> MS. El contenido de flavonas y flavonoles es de 75 mg EQ g<sup>-1</sup> de MS y flavanononas y flavanonoles de 118 mg EP g<sup>-1</sup> de MS (Tabla N° 1).

**Tabla N° 1**  
**Contenido de polifenoles (mg/g)**

| Polifenoles Totales <sup>1</sup> | Flavonas y flavonoles <sup>2</sup> | Flavanononas y Dihidroflavonoles <sup>3</sup> |
|----------------------------------|------------------------------------|---|
| 247 $\pm$ 9                      | 75 $\pm$ 4                         | 118 $\pm$ 11                                  |

**Los resultados fueron expresados como el promedio  $\pm$  la desviación estándar. Contenido de polifenoles totales; flavonas y flavonoles, flavanononas y flavanonoles respectivamente = equivalentes de ácido gálico<sup>1</sup>, quercetina<sup>2</sup>, pinocembrina<sup>3</sup> ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) x volumen total del extracto etanólico  $\div$  masa de la muestra (g)  $\times$  factor de dilución.**

El análisis de la muestra en HPLC ESI MS/MS se realizó en polaridad positiva y en polaridad negativa, mediante método EMS-EPI (Enhanced Mass Scan) que corresponde a un barrido de escaneo general abarcando un rango de masa desde 100- 1000 m/z a una velocidad de 1000 Da/s el cual a su vez se ha asociado a un EPI (Enhanced Product Ion) que es un barrido entre 50-1000 m/z a una velocidad de 4000 Da/s el que finalmente entregará una huella de fragmentación de los compuestos de interés. También se utilizó un método MRM (Multiple Reaction Monitoring) con 4 compuestos en polaridad positiva (8 transiciones en total) y 16 compuestos en polaridad Negativa (30 transiciones en total) (Figura N° 1). El análisis permitió la identificación de 16 compuestos entre flavonas, favonoles, flavanonas, dihidroflavonoles, ácidos fenólicos y sus derivados a través de la utilización de diferentes técnicas como la coelución con estándares, comparación de los tiempos de

retención, los espectros de masa de cada estándar además de la utilización de librería (Figura N° 2). Las Tabla N° 2, N° 3 y N° 4 resume los compuestos obtenidos para cada una de las fracciones analizadas, la identificación de este tipo compuestos generalmente se realizan en base a la búsqueda de la molécula desprotonada junto con la interpretación de los fragmentos obtenidos.

De igual modo se realizó la cuantificación de algunos polifenoles a base de curva de calibración con estándares mediante HPLC DAD (Tabla N° 6). Se identificó apigenina, fenetil éster del ácido cafeico (CAPE), galangina y pinocembrina, la cual se encuentra en mayor concentración, siendo esta de 47,370 mg/L (Tabla N° 5, Figura N° 3).

### Análisis microbiológico

#### Cepas ATCC

El análisis antimicrobiano de las cepas ATCC *S. aureus*, *E. coli*, *C. albicans* y *T. rubrum* con

propóleo chileno, demuestra que existe una efectividad diferencial en cada uno de los aislados analizados. La cepa *S. aureus* presenta una actividad mínima inhibitoria superior a 1000 µg/mL, evidenciándose a esta concentración una disminución del crecimiento de la cepa y un nulo crecimiento a partir de los 1500 µg/mL. En la cepa *E. coli* no se evidenció actividad antimicrobiana a ninguna de las

concentraciones ensayadas en este estudio (1000-4000 µg/mL). La cepa *C. albicans* no creció a ninguna de las concentraciones ensayadas en este estudio, sin embargo se observó crecimiento a concentración de 500 µg/mL (datos no mostrados) (Tabla N° 7). En la cepa fúngica *T. rubrum* no se evidenció crecimiento a partir de la concentración de 1000 µg/mL.

**Tabla N° 2**  
**Flavonas y flavonoles identificados por HPLC-ESI MS/MS en extracto de propóleos**

| Compuesto             | T.R (Min) | (M+H) <sup>+</sup> | (M-H) <sup>-</sup> | Fragmentos (MS <sup>2</sup> m/z) |     |     |     |     | Referencias                                 |
|-----------------------|-----------|--------------------|--------------------|----------------------------------|-----|-----|-----|-----|---|
| Quercetina            | 35.46     | 303                |                    | 229                              | 153 |     |     |     | Librería                                    |
| Kaempferol            | 37.26     | 287                |                    | 153                              | 121 |     |     |     | Librería                                    |
| Apigenina             | 39.1      |                    | 269                | 225                              | 151 |     |     |     | Librería                                    |
| Crisina               | 40.13     |                    | 253                | 209                              |     |     |     |     | [de Melo et al., 2008; Falcao et al., 2012] |
| Galangina             | 40.2      | 271                |                    | 242                              | 197 | 165 | 141 | 105 | Librería                                    |
| Kaempferol Metil Éter | 44.37     |                    | 299                | 227                              |     |     |     |     | [de Melo et al., 2008; Falcao et al., 2012] |

Concentración 10 ppm. T.R: Tiempo de retención

**Tabla N° 3**  
**Flavanonas y dihidroflavonoles identificados por HPLC-ESI MS/MS en extracto de propóleos**

| Compuesto                  | T.R (Min) | (M+H) <sup>+</sup> | (M-H) <sup>-</sup> | Fragmentos (MS <sup>2</sup> m/z) |     |     |     | Referencias  |
|----------------------------|-----------|--------------------|--------------------|----------------------------------|-----|-----|-----|--|
| Pinobanksina               | 36.4      |                    | 271                | 253                              | 197 |     |     | [Gil, 2000; Farre et al., 2004; de Melo et al., 2008; Falcao et al., 2012] |
| Pinocembrina               | 39.31     |                    | 255                | 213                              | 211 | 151 | 108 | Librería   |
| Pinobanksina-3-O-Acetato   | 39.42     |                    |                    | 313                              | 271 | 253 | 91  | [Farre et al., 2004; de Melo et al., 2008; Falcao et al., 2012]            |
| Pinocembrina-5- metil éter | 40.51     |                    | 269                | 227                              |     |     |     | [Farre et al., 2004; de Melo et al., 2008; Falcao et al., 2012]            |

Concentración 10 ppm. T.R: Tiempo de retención

**Tabla N° 4**  
**Ácidos fenólicos y derivados de ácidos fenólicos identificados por HPLC-ESI MS/MS en extracto de propóleos**

| Compuesto                     | T.R (Min) | (M+H) <sup>+</sup> | (M-H) <sup>-</sup> | Fragmentos (MS <sup>2</sup> m/z) |     |     |     | Referencias  |
|-------------------------------|-----------|--------------------|--------------------|----------------------------------|-----|-----|-----|--|
| Ácido cafeico                 | 25.29     |                    | 179                | 135                              | 107 |     |     | Estándar   |
| Ácido cumárico                | 28.84     |                    | 163                | 119                              | 104 |     |     | Estándar   |
| Ácido ferúlico                | 29.8      |                    | 193                | 178                              | 134 |     |     | Estándar   |
| Ácido isoferúlico             | 30.73     |                    | 193                | 178                              | 134 |     |     | [Farré et al., 2004; de Melo et al., 2008; Falcao et al., 2012]            |
| Ácido cafeico bencil éster    | 39.19     |                    | 269                | 178                              | 161 | 134 | 121 | [Farré et al., 2004; de Melo et al., 2008; Falcao et al., 2012]            |
| Fenil éster del ácido cafeico | 39.74     |                    | 283                | 239                              | 179 | 135 |     | [Gil, 2000; Farré et al., 2004; de Melo et al., 2008; Falcao et al., 2012] |

Concentración 10 ppm. T.R: Tiempo de retención

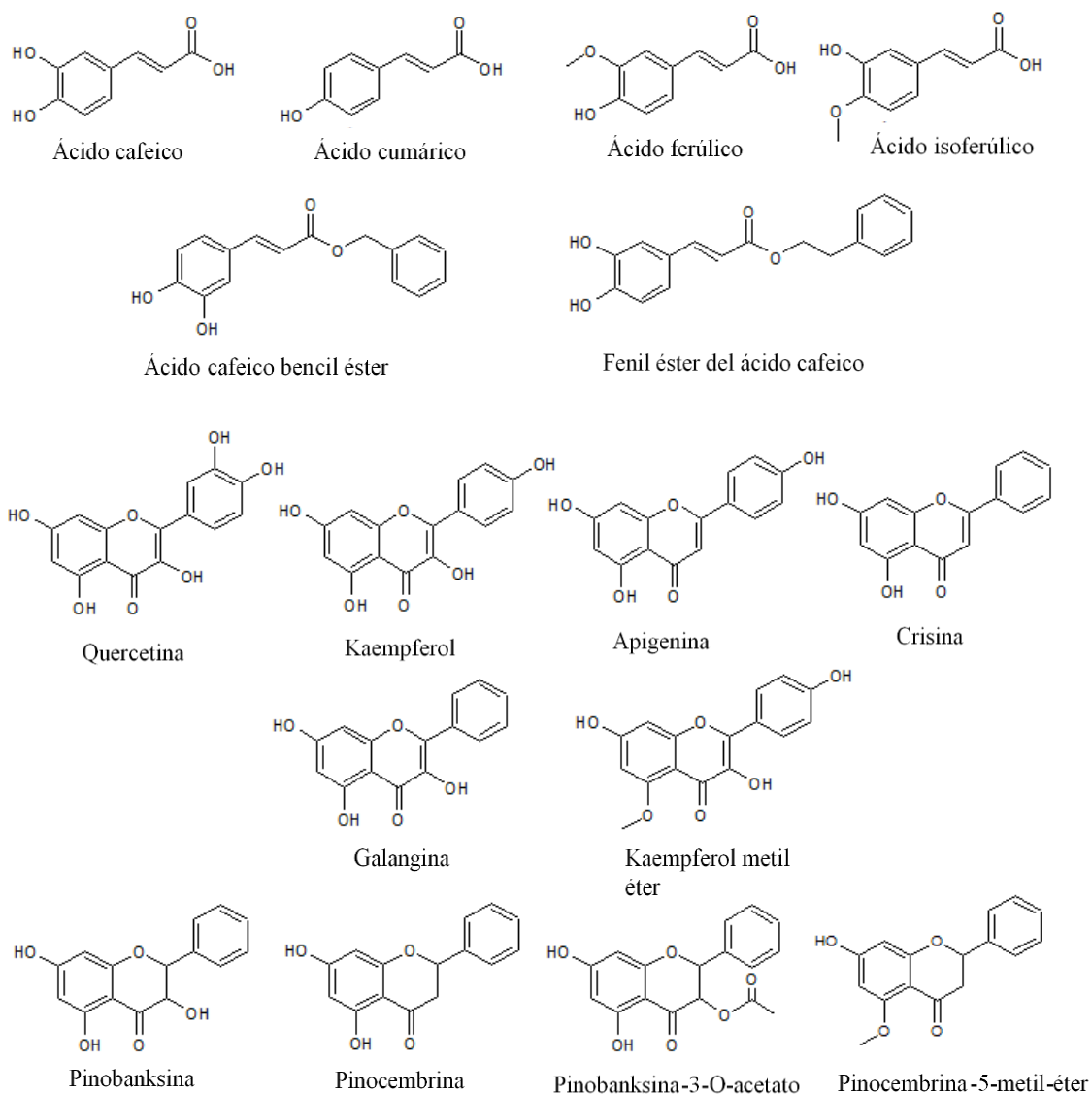


Figura N° 1

Estructuras de diferentes tipos de flavonoides identificados mediante HPLC ESI MS/MS. Diseñado en ACD/ChemSketch v. 12.01 ©2010 software.

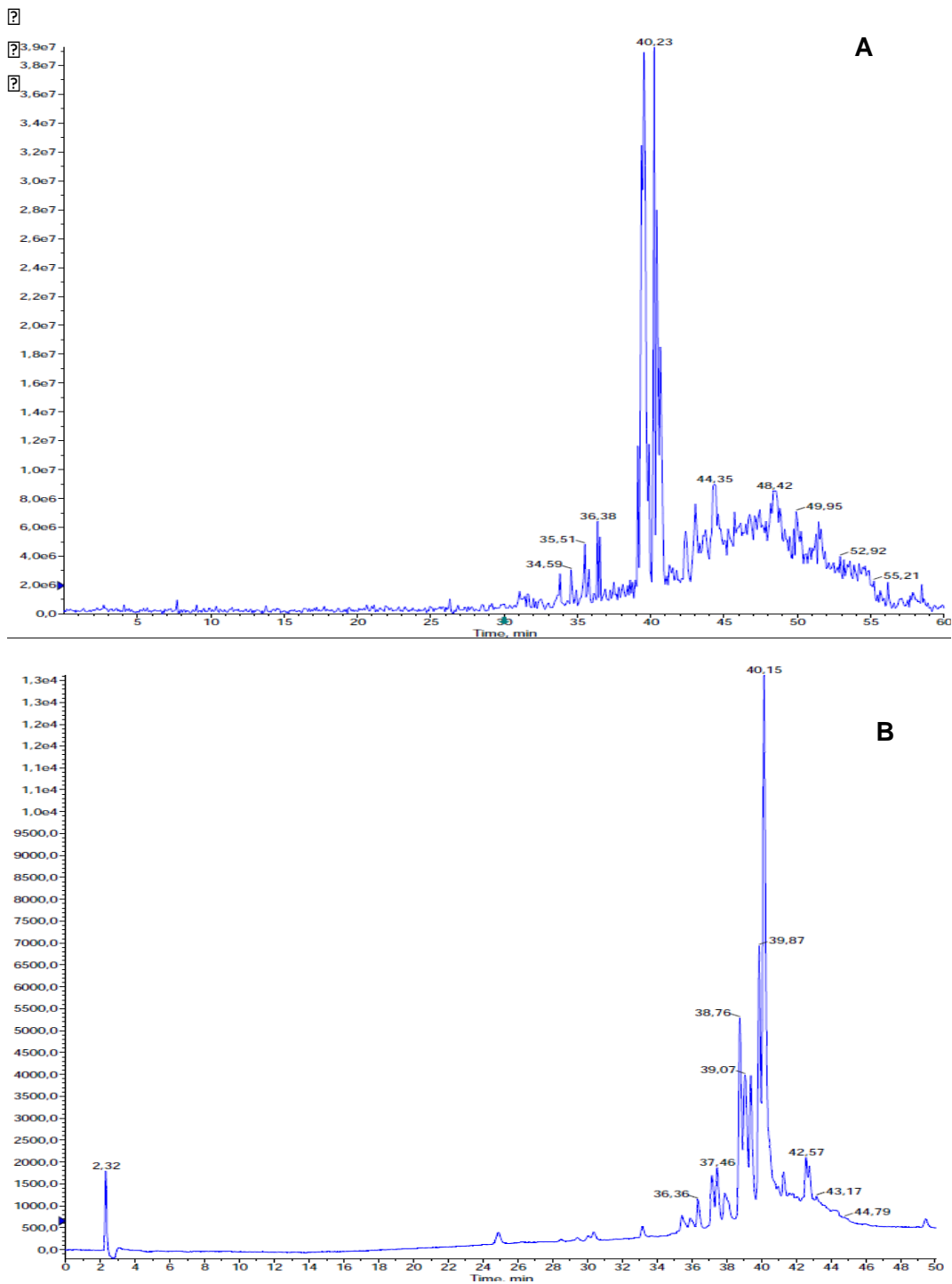


Figura N° 1  
Cromatograma de espectro UV a 360 nm del extracto de propóleos. A) TIC de la muestra en polaridad negativa) ; B) espectro UV de la muestra (360 nm)



**Tabla N° 5**  
**Concentración de compuestos polifenólicos identificados y cuantificados por HPLC-DAD**

| Polifenoles  | Concentración de Polifenoles mg L <sup>-1</sup> |
|--------------|---|
| Pinocembrina | 47,370  |
| Quercetina   | 38,279  |
| CAPE         | 5,798   |
| Galangina    | 4,561   |

La muestra se cuantificó a partir de una solución de extracto de propóleo a concentración de 500 ppm

**Tabla N° 6**

| Flavonoide estándar | Curva de calibración | R <sup>2</sup> |
|---------------------|----------------------|----------------|
| Apigenina           | $y = 62402,9x+0$     | 0,999          |
| Pinocembrina        | $y = 54787,6x+0$     | 0,996          |
| CAPE                | $y = 66587,3x+0$     | 0,999          |
| Galangina           | $y = 56950,2x+0$     | 0,968          |

Ecuación de curva de calibración y coeficientes de correlación calculadas para los estándares de flavonoides a concentraciones que van de 5 a 20 ppm

**Tabla N° 7**  
**Actividad antimicrobiana de propóleos sobre cepas ATCC**

| µg/mL    | <i>E. coli</i> | <i>S. aureus</i> | <i>C. albicans</i> | <i>T. rubrum</i> |
|----------|----------------|------------------|--------------------|------------------|
| vehículo | +++            | +++              | +++                | +++              |
| 1000     | +++            | +                | -                  | -                |
| 1500     | +++            | -                | -                  | NE               |
| 2000     | +++            | -                | -                  | -                |
| 2500     | +++            | -                | -                  | NE               |
| 3000     | +++            | -                | -                  | -                |

- (sin crecimiento), + (crecimiento débil), +++ (fuerte crecimiento) NE (no evaluado)

### Muestras clínicas

Los aislados clínicos bucofaríngeos presentan una susceptibilidad diferencial ante el tratamiento con propóleos, resultando S<sub>1</sub> y S<sub>10</sub> con nulo crecimiento ante las concentraciones analizadas. Los aislados S<sub>2</sub>, S<sub>3</sub> y S<sub>4</sub> presentan una disminución del crecimiento a concentración de 1000 µg/mL y no evidenciándose crecimiento entre 1500 y 4000 µg/mL. En los aislados S<sub>5</sub>, S<sub>6</sub>, S<sub>7</sub> y S<sub>8</sub> fueron los más resistentes al tratamiento con propóleos ya que no se evidenció disminución o cese de crecimiento en ninguna de las

concentraciones analizadas en este estudio (Tabla N° 8).

La actividad antifúngica del propóleo mediante difusión en agar en *T. rubrum* evidenció la efectividad del propóleo en concentraciones de 1000 a 4000 µg/mL evidenciándose nulo crecimiento en comparación al control sin tratamiento (Tabla N° 9).

### Sensibilidad a antibióticos

El aislado bucofaríngeo de *S. aureus* correspondiente a S<sub>5</sub> presentó el mayor grado de resistencia a

antibióticos frente a todos los aislados clínicos analizados, siendo resistente a estos cuatro antibióticos AM, FEP, CF y STX. Los aislados S<sub>4</sub> S<sub>8</sub> S<sub>9</sub> S<sub>10</sub> fueron resistentes solo a un antibiótico, siendo S<sub>4</sub> a FEP y S<sub>8</sub> S<sub>9</sub> S<sub>10</sub> a AM. De los cuales ambos antibióticos presentan similar mecanismo de acción a

nivel de inhibición de síntesis de la última capa de la pared bacteriana. Los aislados S<sub>2</sub> S<sub>3</sub> S<sub>6</sub> fueron resistentes a FEP y GE, y el aislado S<sub>7</sub> fue resistente a AM y CTX. Finalmente el aislado S<sub>1</sub> fue resistente a AM, FEP y GE (Tabla N° 9).

**Tabla N° 8**  
**Actividad antimicrobiana de propóleos sobre aislados clínicos de *S. aureus***

| µg/mL    | S <sub>1</sub> | S <sub>2</sub> | S <sub>3</sub> | S <sub>4</sub> | S <sub>5</sub> | S <sub>6</sub> | S <sub>7</sub> | S <sub>8</sub> | S <sub>9</sub> | S <sub>10</sub> |
|----------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|
| vehículo | +++            | +++            | +++            | +++            | +++            | +++            | +++            | +++            | +++            | +++             |
| 1000     | -              | +              | +              | +              | +++            | +++            | +++            | +++            | +              | -               |
| 1500     | -              | -              | -              | -              | +++            | +++            | +++            | +++            | -              | -               |
| 2000     | -              | -              | -              | -              | +++            | +++            | +++            | +++            | -              | -               |
| 2500     | -              | -              | -              | -              | +++            | +++            | +++            | +++            | -              | -               |
| 3000     | -              | -              | -              | -              | +++            | +++            | +++            | +++            | -              | -               |

S<sub>1-10</sub> corresponde a diferentes aislados clínicos de *S. aureus*. – (sin crecimiento), + (crecimiento débil), +++ (fuerte crecimiento).

**Tabla N° 9**  
**Antibiograma sobre cepas aisladas desde cavidad bucofaríngea.**

| Antibiótico                | S <sub>1</sub> | S <sub>2</sub> | S <sub>3</sub> | S <sub>4</sub> | S <sub>5</sub> | S <sub>6</sub> | S <sub>7</sub> | S <sub>8</sub> | S <sub>9</sub> | S <sub>10</sub> | S <sub>.ATCC</sub> |
|----------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|--------------------|
| Ampicilina                 | R              | S              | S              | S              | R              | R              | R              | R              | R              | R               | R                  |
| Cefepime                   | R              | R              | R              | R              | R              | R              | S              | S              | I              | I               | I                  |
| Cefalotina                 | S              | S              | S              | S              | R              | S              | R              | S              | S              | S               | S                  |
| Cefotaxima                 | S              | S              | S              | S              | S              | S              | S              | S              | S              | S               | S                  |
| Gentamicina                | R              | R              | R              | S              | S              | S              | S              | S              | S              | S               | S                  |
| Levofloxacin               | S              | S              | S              | S              | S              | S              | S              | S              | I              | I               | I                  |
| Trimetoprim-sulfametoxazol | S              | S              | S              | S              | R              | S              | S              | S              | S              | S               | S                  |

**R: resistente, S: sensible, I: intermedio.**

## DISCUSIÓN

El propóleos se ha estudiado de manera exhaustiva por diferentes civilizaciones alrededor del mundo,

logrando identificarse diversas actividades biológicas hasta el día de hoy reportadas como antiinflamatorio, antioxidante, anticancerígeno, entre otros, siendo la

actividad antimicrobiana una de las más analizadas durante los últimos años. Esta efectividad farmacológica estaría dada por la composición química del propóleo, el cual ha sido descrito por diferentes autores debido a la gran diversidad de compuestos químicos presentes en él. La efectividad como antimicrobiano estaría determinada por el lugar y estación del año en el cual fue colectada la muestra de propóleos según (Ramos y Miranda 2007).

En el análisis de los resultados obtenidos sobre la caracterización química de los polifenoles presentes en nuestro extracto mediante HPLC ESI MS/MS, evidencia la presencia de 16 compuestos los cuales concuerdan con algunos de los polifenoles presentes en propóleos de países como Argentina, Azerbaiyán, China, Etiopía Kenia, Italia y España. Dentro de estos compuestos se destaca la presencia

de kaempferol, apigenina, pinocembrina, galangina y crisina. Siendo la flavanona pinocembrina una de las más abundantes, reportándose en concentraciones que van desde el 39% a 63% en extractos etanólicos de propóleos provenientes de aquellos países (Volpi y Bergonzini, 2006). Estos datos concuerdan con los resultados obtenidos mediante HPLC/DAD, donde se observó una alta concentración de pinocembrina (47,370 mg/L), siendo este el metabolito predominante. El dihidroflavonol pinobankina y algunos de sus derivados como Pinobanksina-3-O-Acetato fueron identificados mediante HPLC ESI MS/MS, dichos polifenoles han sido utilizados por diferentes autores por su gran rol antibacterial, los cuales en sinergia con los diversos compuestos bioactivos presentes en esta muestra le brindarían un gran poder antimicrobiano (De Melo *et al.*, 2018).

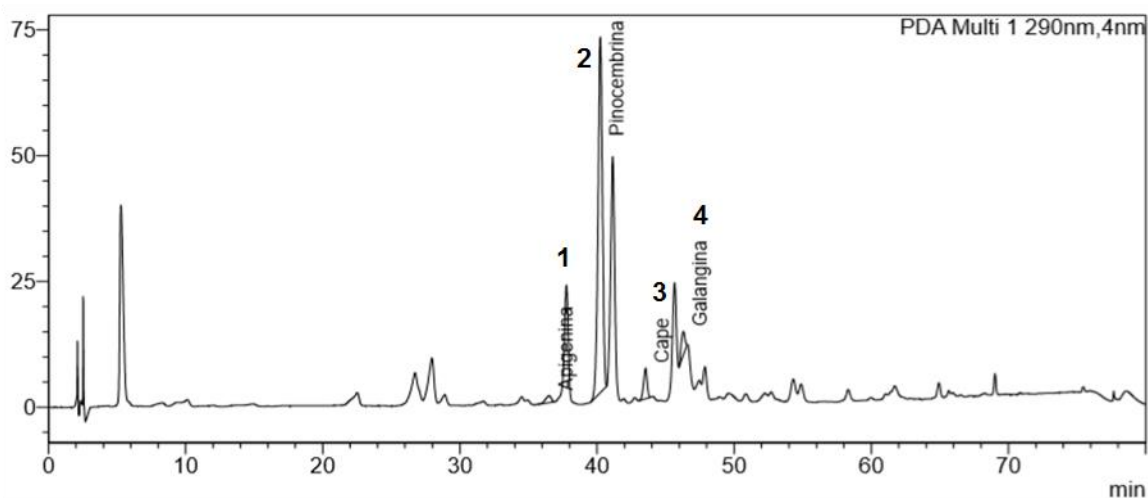


Figura N° 2

**Patrón cromatográfico de un propóleo Chileno. Longitud de onda 290 nm, volumen de inyección 10  $\mu$ L (200 ppm). Los compuestos identificados son a base de estándares: 1, apigenina. 2, pinocembrina. 3, fenetil éster del ácido cafeico (CAPE). 4, galangina. La identificación de los compuestos se realizó en base a estándares mediante curva de calibración.**

En cuanto a la evaluación antibacteriana realizada sobre la cepa *Staphylococcus aureus* (ATCC® 33862™), esta presentó sensibilidad a una concentración superior a 1000  $\mu$ g/mL de propóleos, lo que concuerda con lo reportado por Nina *et al.* (2015) en propóleos chileno procedente de diferentes localidades de la región del Maule. Presentándose CMI que varían desde 62,5 a 1000  $\mu$ g/mL para cepas de *S. aureus* sensibles al antibiótico  $\beta$ -lactámico Meticilina (ATCC® 25923™ y 43300™). Los principales flavonoides identificados por Nina *et al.*

(2015) en propóleos provenientes de la región del Maule, corresponden a crisina, pinocembrina, pinobanksina acetato, galangina y éster del ácido cafeico, obteniéndose resultados concordantes en este estudio en propóleos proveniente de la región del Bio-bío, lo que confirmaría las propiedades antimicrobianas de este grupo de flavonoides sobre esta cepa. A su vez propóleos procedentes de Republica Checa presentan una actividad inhibitoria sobre la clona CAPM 5970 de *S. aureus* desde los 1969  $\mu$ g/mL (Netíková *et al.*, 2013). Siendo estas

concentraciones mucho mayores a las utilizadas con propóleos procedentes de diferentes localidades de Taiwán, las cuales presentan una CMI entre 3,75 a 60  $\mu\text{g/mL}$  (Lu *et al.*, 2005). Siendo aun mayores las concentraciones de propóleos utilizados en muestras de México, los cuales presentan una CMB desde 0,93 a 25  $\text{mg/mL}$  dependiendo de la localidad de donde fue colectada la muestra, correspondiendo estos a las localidades de Huasteca Potosina: Ejido Laguna del Mante, Los Sabinos, La Loma y Tamazunchale (Carrillo *et al.*, 2011).

En este estudio no fue posible evidenciar la efectividad del propóleo chileno sobre la cepa Gram negativa *E. coli*, utilizando concentraciones desde 1000 a 3000  $\mu\text{g/mL}$ . Sin embargo, propóleos procedentes de diferentes localidades de Argentina presentan una CMI de 14,3 a 30,2  $\text{mg/mL}$ , las cuales son concentraciones muy altas comparadas a las evaluadas en nuestro ensayo (Tosi *et al.*, 2007). Los resultados obtenidos en este estudio sobre *E. coli* concuerdan con lo reportado por Palomino *et al.* (2009), donde se describe que las bacterias Gram negativas, al poseer una membrana adicional llamada "estructura OM" esta le confiere un grado de resistencia a antimicrobianos, por lo que se requieren de grandes dosis para poder ejercer una acción antibacteriana.

En cuanto a la actividad antifúngica del propóleo sobre la cepa ATCC *C. albicans* se observó una CMI superior a 500  $\mu\text{g/mL}$ , evidenciándose crecimiento nulo a partir de los 1000  $\mu\text{g/mL}$ , sin embargo Herrera *et al.* (2010), reportó que propóleos comerciales chilenos correspondientes a diferentes regiones del país presentan una CMI que varía desde 197 a 441  $\mu\text{g/mL}$ , lo cual puede estar influenciado por la variación en la cepa, ya que estas correspondieron a aislados clínicos chilenos. Sin embargo la composición química de estos propóleos son similares a la muestra de propóleos utilizada en este estudio, destacándose pinocembrina, quercetina, apigenina, kaemferol, ácido cafeico, CAPE, siendo estos característicos de propóleos procedentes de Chile. Por otro lado propóleos mexicanos comerciales se observaron CMI en cepa ATCC de *C. albicans* que varía dependiendo del lugar donde se obtuvo el propóleo desde 600 a  $\geq 10000$   $\mu\text{g/mL}$  (Quintero-Mora *et al.*, 2008).

Por otro lado, extractos de propóleos provenientes de Brasil presentan una actividad fungistática sobre el dermatofito *T. rubrum* a concentración de 64 a 512  $\mu\text{g/mL}$  y la concentración mínima fungicida a partir de 1024  $\mu\text{g/mL}$  en un extracto etanólico de propóleos verde (Siqueira *et al.*,

2009), lo que concuerda con lo reportado en este estudio con una CMI de 1000  $\mu\text{g/mL}$ .

En cuanto a la efectividad antibacteriana del propóleo y los antibióticos ante los aislados clínicos de *S. aureus* se evidenciaron respuestas diferenciales. Observándose en algunos de los 10 aislados bucofaríngeos utilizados en este estudio respuestas de inhibición con propóleos a partir de los 1000  $\mu\text{g/mL}$  o nula efectividad desde 1000 a 4000  $\mu\text{g/mL}$  en otros. Además, se evidenció resistencia a múltiples antibióticos con diferentes mecanismos de acción. La resistencia a antibióticos puede estar mediada por diferentes mecanismos de acción, las cuales incluyen la alteración del blanco del antibiótico, la inactivación o degradación del antimicrobiano, provocar una disminución de la permeabilidad en la membrana celular a los antibióticos y reducir la concentración intracelular de antibiótico a través de la utilización de bombas de expulsión activas (Jang, 2016). Los perfiles de resistencia al propóleo que se presentaron en algunos aislados estarían relacionada con la resistencia a antibióticos de los aislados clínicos analizados. Los aislados bucofaríngeos de *S. aureus* obtenidos de muestras clínicas presentan perfiles de resistencia variados, incluyendo cepas multirresistentes, entre estos mecanismos de defensa de los microorganismos existen algunos específicos que se desarrollan por una respuesta secuencial a la presión selectiva impuesta por el contacto con antimicrobianos.

## CONCLUSIÓN

Se concluye que el propóleo chileno utilizado de origen multifloral presenta una diversidad de compuestos destacándose la presencia de pinocembrina y pinobanksina en alta concentración lo cual le confiere junto con la sinergia de los demás compuestos una actividad antimicrobiana diferencial sobre los diversos microorganismos analizados, logrando evidenciar actividad antimicrobiana sobre bacterias Gram positivo *S. aureus*, levadura *C. albicans* y el hongo dermatofito *T. rubrum*. Sin embargo, no se observó actividad antibacteriana sobre bacteria Gram negativa como *E. coli*. Este propóleo presenta una actividad selectiva dosis-dependiente frente a patógenos clínicos analizados en este estudio debido a que presentarían una alta resistencia a antibióticos con diferentes mecanismos de acción.

## AGRADECIMIENTOS

Becas CONICYT de doctorado nacional y de pasantía en el extranjero 21140816 y 21120557,

llevada a cabo en la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de la Salle, México.

## REFERENCIAS

- Andreu A, Planells I. 2008. Grupo cooperativo español para el estudio de la sensibilidad antimicrobiana de los patógenos urinarios. Etiología de la infección urinaria baja adquirida en la comunidad y resistencia de *Escherichia coli* a los antimicrobianos de primera línea. Estudio nacional multicéntrico. **Med Clin** 130: 481 - 486.
- Bolado-Martínez E, Nevárez A, Candia-Plata M. 2018. Vigilancia de la resistencia bacteriana en instituciones de salud de la ciudad de Hermosillo, Sonora, México. **Salud Pública Méx** 60: 117 - 119.
- Cabrera C, Gómez R, Zúñiga, A. 2007. La resistencia de bacterias a antibióticos, antisépticos y desinfectantes una manifestación de los mecanismos de supervivencia y adaptación. **Colomb Med** 38: 149 - 158.
- Carrillo M, Castillo L, Mauricio R. 2011. Evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos de la Huasteca Potosina (México). **Inf Tecnol** 22: 21 - 28.
- Chang C, Yang M, Wen H, Chern J. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. **J Food Drug Anal** 10: 178 - 182.
- Clinical and laboratory standards institute. 2017. For Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeast. 4th ed. **Clinical and Laboratory Standards Institute** standard M27. Wayne, PA, USA.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. 2017. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 27th ed. **Clinical and Laboratory Standards Institute** supplement M100. Wayne, PA, USA.
- De-Melo, A, Estevinho L, Moreira M, Delerue-Matos C, Freitas A, Barth O, Almeida-Muradian, L. 2018. Phenolic profile by HPLC-MS, biological potential, and nutritional value of a promising food: Monofloral bee pollen. **J Food Biochem** e12536.
- Falcao S, Vale N, Gomes P. 2012. Phenolic profiling of portuguese propolis by LC-MS spectrometry: uncommon propolis rich in flavonoid glycosides. **Phytochem Anal** 24: 309 - 318.
- Falcao S, Vilas-Boas M, Estevinho L, Barros C. 2010. Phenolic characterization of Northeast Portuguese propolis: Usual and unusual compounds. **Anal Bioanal Chem** 396: 887 - 897.
- Farré R, Frassetto I, Sánchez A. 2004. El propolis y la salud. **Ars Pharm** 45: 21 - 43.
- Gardana C, Scaglianti M, Pietta P, Simonetti P. 2007. Analysis of the polyphenolic fraction of propolis from different sources by liquid chromatography- tandem mass spectrometry. **J Pharm Biomed Anal** 45: 390 - 399.
- Gil M. 2000. *Staphylococcus aureus*: Microbiología y aspectos moleculares de la resistencia a metilina. **Rev Chil Infectol** 17: 145 - 152.
- Gulcin I, Bursal E, Sehitoglu M, Bilsel M, Goren A. 2010. Polyphenol contents and antioxidant activity of lyophilized aqueous extract of propolis from Erzurum, Turkey. **Food Chem Toxicol** 48: 2227 - 2238.
- Herrera C, Fritz O, Montenegro G, Alvear M, del Sol M, Salazar L. 2010. El propóleo reduce la esteatosis hepática inducida por dieta en ratones. **Int J Morphol** 28: 75 - 84.
- Jang S. 2016. Multidrug efflux pumps in *Staphylococcus aureus* and their clinical implications. **J Microbiol** 54: 1 - 8.
- Lillo A, Carvajal-Caiconte F, Núñez D, Balboa N, Alvear M. 2016. Cuantificación espectrofotométrica de compuestos fenólicos y actividad antioxidante en distintos berries nativos del Cono Sur de América. **RIA** 42: 168 - 174.
- Lu L, Chen Y, Chou C. 2005. Antibacterial activity of propolis against *Staphylococcus aureus*. **Int J Food Microbiol** 102: 213 - 220.
- Manzano-Gayosso P, Méndez-Tovar L, Hernández-Hernández F, López-Martínez R. 2008. La resistencia a los antifúngicos: un problema emergente en México. **Gac Med Méx** 144: 23 - 26.
- Méndez-Tovar L, Manzano-Gayosso P, Velásquez-Hernández V, Millan-Chiu B, Hernández-Hernández F, Mondragón-González R, López-Martínez R. 2007. Resistencia a compuestos azólicos de aislamientos clínicos de *Trichophyton* spp. **Rev Iberoam Micol** 24: 320 - 322.
- Netíková L, Bogusch P, Heneberg P. 2013. Czech ethanol-free propolis extract displays inhibitory activity against a broad spectrum of bacterial and fungal pathogens. **J Food Sci** 78: 1421 - 1429.
- Nina N, Quispe C, Jiménez-Aspee F, Theoduloz C, Feresín G, Lima B, Schmeda-Hirschmann G.

2015. Antibacterial activity, antioxidant effect and chemical composition of propolis from the region del Maule, Central Chile. **Molecules** 20: 18144 - 18167.
- Núñez D, Balboa N, Alvear M, Cerón A, Abarzúa K, Vasconcellos A. 2018. Evaluación de la actividad anti-inflamatoria de propóleos chilenos sobre cortes histológicos de orejas de ratón. **Int J Morphol** 36: 189 - 193.
- Ortigoza-Medrano E, Arroyo-Espinosa D. 2014. Susceptibilidad *in vitro* de las especies de *Candida* a los antifúngicos en el Hospital de especialidades del Centro Médico nacional de occidente. **Med Int Mex** 30: 373 - 380.
- Palomino R, García P, Gil G, Jesús H, Benjamín A, Durango R. 2009. Determinación del contenido de fenoles y evaluación de la actividad antioxidante de propóleos recolectados en el departamento de Antioquia (Colombia). **Vitae** 16: 388 - 395.
- Peña R. 2008. Estandarización en propóleos: antecedentes químicos y biológicos. **Cienc Inv Agr** 35: 17 - 26.
- Ponce A, Millones P. 2015. Efectividad antibacteriana de productos naturales frente a microorganismos patógenos de la flora oral. **In Crescendo** 2: 530 - 537.
- Quintero-Mora M, Londoño-Orozco A, Hernández-Hernández F, Manzano-Gayosso P, López-Martínez R, Soto-Zárate C, Cruz-Sánchez T. 2008. Efecto de extractos de propóleos mexicanos de *Apis mellifera* sobre el crecimiento *in vitro* de *Candida albicans*. **Rev Iberoam Micol** 25: 22 - 26.
- Ramos A, Miranda J. 2007. Propolis: a review of its anti-inflammatory and healing actions. **J Venom Anim Toxins incl Trop** 13: 697 - 710.
- Sforcin J. 2007. Propolis and the immune system: a review. **J Ethnopharmacol** 113: 1 - 14.
- Siqueira A, Gomes B, Cambuim I, Maia R, Abreu S, Souza-Motta C, Porto A. 2009. *Trichophyton* species susceptibility to green and red propolis from Brazil. **Lett Appl Microbiol** 48: 90 - 96.
- Stepanović S, Antić N, Dakić I, Švabić-Vlahović M. 2003. *In vitro* antimicrobial activity of propolis and synergism between propolis and antimicrobial drugs. **Microbiol Res** 158: 353 - 357.
- Toreti V, Sato H, Pastore G, Park Y. 2013. Recent progress of propolis for its biological and chemical compositions and its botanical origin. **J Evid Based Complementary Altern Med** 13 pages.
- Tosi A, Ré E, Ortega M, Cazzoli A. 2007. Food preservative based on propolis: Bacteriostatic activity of propolis polyphenols and flavonoids upon *Escherichia coli*. **Food Chem** 104: 1025 - 1029.
- Valenzuela G, Castro C, Figueroa C, Barriga A, Silva X, de las Heras B, Delporte C. 2015. Anti-inflammatory activity and phenolic profile of propolis from two locations in Región Metropolitana de Santiago, Chile. **J Ethnopharmacol** 168: 37 - 44.
- Volpi, N., Bergonzini, G. 2006. Analysis of flavonoids from propolis by on-line HPLC-electrospray mass spectrometry. **J Pharm Biomed Anal** 42: 354 - 361.