

Actividad fungistática y fungicida de extractos etanólicos de propóleos sobre el crecimiento *in vitro* de cepas del género *Candida*

Fungistatic and fungicidal activity ethanolic propolis extracts on the *in vitro* growth of strains of *Candida*

Milagros Joya¹, Marielsa Gil², Gilberto Bastidas-Pacheco³

Fecha de recepción: 21 de julio de 2016
Fecha de aprobación: 7 de octubre de 2016

Joya, M; Gil, M; Bastidas-Pacheco, G. Actividad fungistática y fungicida de extractos etanólicos de propóleos sobre el crecimiento *in vitro* de cepas del género *Candida*. *Tecnología en Marcha*. Vol. 30-3. Julio-Setiembre 2017. Pág 3-11.

DOI: 10.18845/tm.v30i3.3268



- 1 Departamento de Microbiología, Escuela de Ciencias Biomédicas, Universidad de Carabobo. Médico Cirujano, Doctora en Ciencias Médica de la Universidad de Carabobo. Venezuela. Correo electrónico: milajoya@gmail.com.
- 2 Laboratorio de Microbiología. Escuela de Ciencias Biomédicas y Tecnológicas, Universidad de Carabobo. Venezuela. Bioanalista/Microbióloga. Correo electrónico: marielsagilfd@hotmail.com.
- 3 Departamento de Salud Pública y Centro de Investigaciones Médicas y Biotecnológicas, Universidad de Carabobo. Venezuela. Médico Cirujano, Doctor en parasitología. Correo electrónico: bastidasprotozoo@hotmail.com.

Palabras clave

Propóleos; *Apis mellifera*; *Candida* spp.; actividad fungistática; actividad fungicida.

Resumen

Los extractos etanólicos del propóleos poseen actividad antifúngica en diferentes especies de levaduras, propiedad de importancia por ser una opción terapéutica económica y poco tóxica respecto a los antimicóticos tradicionales, de particular utilidad sobre especies del complejo *Candida albicans*, patógeno oportunista. A pesar de que la composición química general del propóleos es similar en las distintas regiones del mundo, su actividad antifúngica no parece serlo. El objetivo fue determinar la actividad fungistática y fungicida de propóleos venezolano y de 3 regiones del mundo. Para ello cepas del Complejo *C. albicans*, *C. guilliermondii*, *C. krusei* y *C. tropicalis* se enfrentaron a distintas concentraciones de extractos etanólicos de propóleos. Los propóleos de mayor actividad biológica fueron los de Alemania e Italia (10,2 mg/mL), seguidos por el de Venezuela (15,6 mg/mL) y España (18,8 mg/mL). La CMI en las especies más sensibles a los propóleos fueron *C. krusei* y *C. guilliermondii* (8,6 mg/mL como promedio de los 4 propóleos). Los extractos etanólicos de propóleos italiano y alemán son fungicidas en todas las cepas estudiadas en diluciones de 1/32 (concentración final de 3,12 mg/dL). Se concluye que los extractos etanólicos de propóleos tienen efectos fungistáticos y fungicidas sobre las especies del Complejo *C. albicans*, *C. krusei*, *C. guilliermondii* y *C. tropicalis*; que *C. tropicalis* es la especie más resistente a la acción biológica del propóleos y *C. krusei* y *C. guilliermondii* las más sensibles; que los propóleos de Alemania e Italia son los más efectivos contra las especies de *Candida* aisladas de pacientes venezolanas.

Keywords

Propolis; *Apis mellifera*; *Candida* spp.; fungistatic activity; fungicidal activity.

Abstract

Ethanol extracts of propolis have antifungal activity in different species of yeast, owned by importance as a therapeutic economic option and low toxicity compared to traditional antifungal, particularly useful on species of *Candida albicans*, opportunistic pathogen. Although the overall chemical composition of propolis is similar in different regions of the world, their antifungal activity does not seem to be. The objective was to determine the fungistatic and fungicidal activity of Venezuelan propolis and 4 parts of the world. To do strains of *C. albicans*, *C. guilliermondii*, *C. krusei* and *C. tropicalis* faced different concentrations of ethanol extracts of propolis. Propolis increased biological activity were from Germany and Italy (10.2 mg / mL), followed by that of Venezuela (15.6 mg / mL) and in Spain (18.8 mg / mL). The CMI in the most sensitive species to propolis were *C. krusei* and *C. guilliermondii* (8.6 mg / mL as an average of 4 propolis). Ethanol extracts of propolis Italian and German origin are fungicides in all strains tested at dilutions of 1/32 (final concentration of 3.12 mg/dL). It is concluded that ethanol extracts of propolis have significant fungistatic and fungicidal effects on species *C. albicans*, *C. krusei*, *C. guilliermondii* and *C. tropicalis*; *C. tropicalis* is the most resistant to biological action of propolis and *C. krusei* and *C. guilliermondii* the most sensitive species; propolis that Germany and Italy are the most effective against species of *Candida* isolated from Venezuelan patients.

Introducción

El propóleo es una sustancia resinosa, gomosa y balsámica recolectadas por las abejas (*Apis mellifera*) con el fin de garantizar la asepsia de la colmena porque es particularmente útil en el recubrimiento de los panales antes de la puesta de huevos y para embalsamar animales muertos en el interior de la colmena que, por su tamaño no pueden ser expulsados, además este compuesto es útil en el tratamiento de afecciones humanas [1]-[2]. Es conveniente resaltar que la composición química del propóleo además de ser compleja, porque hasta ahora se le han descrito más de 250 compuestos, puede variar en dependencia directa de la flora del lugar de origen, de la temporada de recolección, del tipo de vegetación, de la especie de abeja, del solvente empleado para su extracción y de la región geográfica, no obstante, y en general en su composición se han aislado terpenos polisacáridos, ácidos aromáticos, polifenos, ésteres de ácidos fenólicos, minerales, vitaminas y aminoácidos, compuestos que sin duda le dan un amplio espectro de propiedades biológicas y farmacológicas, entre las que destacan las antioxidantes, antiinflamatorias, hipoglicemiantes, inmunomoduladoras, antitumorales, anticancerígenas, antiulcéricas, hepatoprotectoras, cardioprotectoras, neuroprotectoras, antibiótica y antifúngica [2]-[3]-[4]-[5]-[6] [7]-[8]-[9]-[10].

La actividad antifúngica de los extractos de propóleo se observa por inhibición del crecimiento y proliferación en diferentes especies de levaduras como el Complejo *Candida albicans* y *C. glabrata*, acción posiblemente debida, al ácido cafeico, el p. coumarate de bencilo, la pinocambрина y la pinobanksina. Entonces el propóleo puede vislumbrarse como potencial tratamiento contra las infecciones por hongos, tanto levaduriformes como filamentosos sobre la base del constante aumento de la prevalencia de las micosis, del desarrollo de resistencia a agentes antimicóticos actuales, de los efectos adversos que poseen estos antimicóticos y porque la terapia con propóleo resulta económica y poco tóxica (dosis diarias de 1.400 mg/kg no ocasiona efectos adversos en ratones, aunque el consumo bruto en el hombre puede generar náuseas), de allí la necesidad de realizar ensayos sobre su efecto antimicótico y también porque la composición química del propóleo aunque similar puede presentar pequeñas variaciones en distintas regiones del mundo que requieren ser precisadas [1]-[2]-[3]-[11]-[12]-[13]-[14].

Además en países en vía de desarrollo donde son frecuentes las enfermedades debilitantes y la desnutrición se producen generalmente micosis oportunistas, especialmente por el género *Candida spp*, fundamentalmente en mucosas de la boca y vagina, en piel, uñas y de manera excepcional en pulmones e intestino; además entre 2% y 15% de los sujetos colonizados pueden terminar en candidiasis diseminada, con mortalidad de hasta 79%, en consecuencia es preciso adelantar investigaciones en países como Venezuela donde la información es escasa, a pesar de que la actividad biológica del extracto etanólico de propóleo sobre *Candida spp*. ha sido demostrada en diferentes regiones geográficas como Egipto, Turquía, Bulgaria, Brasil, El Salvador y Cuba, por tanto, el objetivo de este trabajo fue determinar la efectividad de propóleos procedentes de 4 regiones geográficas distintas sobre el crecimiento de *Candida spp* [15]-[16]-[17]-[18]-[19]-[20]-[21].

Materiales y métodos

Extractos etanólicos de propóleos

En este estudio se emplearon 4 propóleos comerciales al 60% (concentración final de 100mg/mL) producido por abejas *Apis mellifera* de regiones geográficas de Alemania (Berlín), España (Barcelona), Italia (Roma) y Venezuela (Carabobo). En la preparación, por parte del apiario, de estos propóleos se usó como solvente etanol al 70%.

Cepas de hongos

Se usaron 4 cepas patógenas del género *Candida* spp. de origen humano obtenidas de exudado vaginal de cuatro mujeres distintas del estado Carabobo, Venezuela, estas fueron complejo *C. albicans*, *C. guilliermondii*, *C. krusei* y *C. tropicales*. Las cepas fueron mantenidas hasta su utilización en el cepario del Laboratorio de Diagnóstico Bacteriológico del Departamento de Microbiología de la Universidad de Carabobo. Las 4 cepas fueron identificadas, a través, de las características macro y microscópicas de cepas de cultivo por medio de procedimientos tradicionales (filamentación en suero, producción de clamidoconidios en agar harina de maíz, crecimiento en CHROMagar *Candida*) (Sawaya et al., 2002). Las cepas *C. albicans* (ATCC 90028), *C. krusei* (OD-18 CG3 220o3), *C. guilliermondii* (SA-34A 72o6) y *C. tropicalis* (OD-17 CG2 220o2) fue incluida como control de calidad.

Macrodilución de las suspensiones micóticas con extractos etanólicos de propóleos

Las cepas para la pruebas fueron sembradas en caldo Sabouroud e incubadas a temperatura ambiente por 24 horas para estimular el crecimiento, para ser luego repicadas en agar sangre y mantenidas por 24 horas a temperatura ambiente y finalmente suspendidas en caldo Sabouroud hasta alcanzar la turbidez del patrón Mc. Farland de 1% equivalente a 3.0×10^8 UFC/mL en cámara de Neubauer. Se preparó una batería de 8 tubos de ensayos de 12x75 para cada extracto etanólico de propóleos. En 6 tubos se realizaron diluciones seriadas (de 1mL) de cada propóleos a partir de 60% (100mg/dL), $\frac{1}{2}$ (30%), $\frac{1}{4}$ (15%), $\frac{1}{8}$ (7,5%), $\frac{1}{16}$ (3,75%) y $\frac{1}{32}$ (1,87%), en concentraciones que oscilan entre 13,12 y 100 mg/mL. Luego se agregó a cada dilución 100 μ L ($0,3 \times 10^8$ UFC) de la suspensión al 1% de Mc Farland de cada hongo, los extraídos de secreción vaginal y los de referencia. Como controles se emplearon un tubo de ensayo con solo cepa y otro con solo el propóleos, con esto se completa la batería de 8 tubos. Las mezclas se homogeneizan y mantienen a temperatura ambiente por 24, 48 y 72 horas. Las pruebas se realizan por triplicado para cada extracto etanólico de propóleos.

Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

Al término de la incubación se traspasó 10 μ L de cada tubo a placas de agar sabouroud utilizando un asa calibrada, realizando la técnica de sembrado por agotamiento (Herrera, 2010), posteriormente se incubo durante 24, 48 y 72 horas a temperatura ambiente, al término de este tiempo se realizó inspección visual de cada placa. La CMI se determinó como la concentración mínima de extracto etanólico de propóleos donde no hubo crecimiento visible después del periodo de incubación [22].

Determinación de la concentración mínima fungicida (CMF)

En este caso de cada tubo de dilución se obtuvo una muestra de 10 μ L y se inoculo en caldos de agar sabouroud, los caldos se incuban por 72 horas tiempo máximo en que se observa crecimiento del cultivo control y se realiza observación visual de los caldos. La CMF fue considerada como la concentración más baja en que se inhibe el crecimiento del hongo (en más de 90%) en el medio liquido utilizado [23].

Resultados

Se observó actividad inhibitoria en todas las especies de *Candida* y con los propóleos comerciales de las cuatro regiones examinadas, pero con variaciones en la CMI entre los diferentes extractos de propóleos, los de mayor actividad biológica fueron los procedentes de Alemania e Italia (10,2 mg/mL como promedio de la cepa tipo y estudiadas), seguidos por el extracto etanólico de propóleos de Venezuela (15,6 mg/mL como promedio de la cepa

tipo y estudiadas) y finalmente el de España (18,8 mg/mL como promedio de la cepa tipo y estudiadas). Con todos los extractos de propóleos la CMI fue igual para cepas de referencia y estudiadas. Todas las especies de *Candida* vieron inhibido su crecimiento en consideración a la concentración de extractos etanólicos de propóleos en el siguiente orden: *C. krusei* y *C. guilliermondii* (8,6 mg/mL como promedio de los 4 propóleos), *C. albicans* (12,5 mg/mL como promedio de los 4 propóleos) y *C. tropicalis* (concentración promedio con todos los extracto etanólicos de propóleos fue de 25 mg/mL como promedio de los 4 propóleos) (cuadro 1).

Cuadro 1. Valores de concentración mínima inhibitoria de extractos de propóleos sobre cepas de *Candida* spp. de referencia y aislada de secreciones vaginales de mujeres del estado Carabobo.

Extracto de propóleos	CMI (mg/mL)							
	<i>C. albicans</i> (ATCC 90028)	<i>C. albicans</i> (muestra)	<i>C. krusei</i> (OD-18 CG3 220o3)	<i>C. krusei</i> (muestra)	<i>C. guilliermondii</i> (SA-34A 72o6)	<i>C. guilliermondii</i> (muestra)	<i>C. tropicalis</i> (OD-17 CG2 220o2)	<i>C. tropicalis</i> (muestra)
Alemania	6,25	6,25	6,25	6,25	3,12	3,12	25	25
España	25	25	12,5	12,5	12,5	12,5	25	25
Italia	6,25	6,25	3,12	3,12	6,25	6,25	25	25
Venezuela	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	25	25

Fuente: Pruebas fungistáticas realizadas por los investigadores.

Los extractos etanólicos de propóleos de origen italiano y alemán inhibe el crecimiento en más de 90% en todas las cepas estudiadas en diluciones de 1/32, cuya concentración final es de 3,12 mg/mL, mientras que el español y el venezolano lo hacen para todas las cepas estudiadas a partir de la dilución de 1/8 (12,5 mg/mL), es decir, son 4 veces menos eficientes que los propóleos Alemán e Italiano. En todos los casos *C. tropicalis* requiere de diluciones de 1/4 (25 mg/mL) para que pueda inhibirse en más de 90% su crecimiento en medio sólido. En resumen se aprecia que la actividad fungicida es similar entre propóleos de Alemania e Italia y entre los originarios de España y Venezuela (cuadro 2).

Discusión

Desde finales de la década de los 80 se reporta actividad fungistática y fungicida de los extractos etanólicos sobre levaduras aisladas de distintas partes del cuerpo humano, hecho también corroborado en esta investigación, pues se observó actividad inhibitoria en todas las especies de *Candida*. examinadas, pero con variaciones en la CMI y CMF, al respecto la mayor actividad biológica la mostraron los extractos etanólicos de propóleos de Alemania e Italia versus los de España y Venezuela atribuible este hallazgo a la variabilidad en la composición química ya registrada en varias regiones del mundo, ya que, hasta ahora, aunque se tienen indicios, no se ha demostrado que exista una sustancia individual o un grupo de ellas que sea la responsable directa de la actividad biológica y se cree que las diferencias en cuanto a CMI y CMF se deba a una acción sinérgica entre diferente compuestos característicos de cada propóleos [23]-[24]-[25]-[26].

Cuadro 2. Valores de concentración mínima fungicida de extractos de propóleos sobre cepas de *Candida* spp. de referencia y aislada de secreciones vaginales de mujeres del estado Carabobo.

	CMF (diluciones)																			
	Alemania					España					Italia					Venezuela				
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32
<i>C. albicans</i>	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+
<i>C. krusei</i>	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+
<i>C. guilliermondii</i>	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+
<i>C. tropicalis</i>	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+

Fuente: Pruebas fungistáticas realizadas por el investigador.

-: inhibición del crecimiento $\leq 90\%$; +: inhibición del crecimiento $>90\%$.

1/2: concentración extracto etanólico de propóleos al 30%; 1/4: concentración extracto etanólico de propóleos al 15%; 1/8: concentración extracto etanólico de propóleos al 37,5%; 1/16: concentración extracto etanólico de propóleos al 3,75%; 1/32: concentración extracto etanólico de propóleos al 1,87%.

En este sentido, en Europa estudios con propóleos y su efecto sobre la inhibición del crecimiento de hongos del tipo Complejo *C. albicans* revelan, por ejemplo, que propóleos de Francia son más efectivos que los de Alemania y Austria. Por otro lado, la actividad fungicida de los extractos etanólicos de propóleos para todas las especies de *Candida* aquí reportadas se ubica entre 3,12 y 12,5 mg/mL, bastante por encima de lo hallado en otras investigaciones, con rangos que se desplazan de 0,55 a 7 mg/mL, igualmente se evidencian diferencias con otros reportes en cuanto a la sensibilidad que esgrimen las especies de *Candida* spp. al extracto de propóleos, toda vez que en este trabajo las especies más sensibles fueron *C. krusei* y *C. guilliermondii*, seguida de *C. albicans* y finalmente *C. tropicalis*, mientras que, *C. albicans* resulto la más sensible al efecto inhibitorio del propóleos en otros estudios, diferencia atribuible al riesgo incrementado de alteración en la concentración de los compuesto químicos que puede describirse con los propóleos de origen comercial [1]-[3]-[12]-[27]-[28]-[29].

Independientemente de las concentraciones descritas en este y otros reportes se comprueba la propiedad antifúngica del propóleos que resulta de especial importancia por ser una opción terapéutica económica y poco toxica, respecto a los antimicóticos tradicionales, interés que se ve favorecido por la inclinación del ser humano hacia el aprovechamiento de productos naturales para afrontar sus problemas de salud, particularmente porque estos extractos etanólicos de propóleos han resultado ser tan efectivos como la nistatina e incluso superan a otros antifúngicos como clotrimazol, econozol y fluconazol en el abordaje terapéutico de candidiosis vaginal y oral de portadores de HIV en países latinoamericanos como Argentina, Brasil, Cuba, México y El Salvador, por tanto resulta oportuna su aplicación como antimicótico en pacientes con déficit nutricionales y otros enfermedades debilitantes que con frecuencia afecta a la población económicamente más vulnerable de países en vía de desarrollo [1]-[3]-[30]-[31]-[32]-[33]-[34]-[35]-[36]-[37]-[38]-[39].

Conclusiones

Los extractos etanólicos de propóleos tienen importantes efectos fungistáticos y fungicidas sobre las especies *C. albicans*, *C. krusei*, *C. guilliermondii* y *C. tropicalis*; la *C. tropicalis* es la especie más resistente a la acción biológica del propóleos y *C. krusei* y *C. guilliermondii* las más sensibles; los extractos etanólicos de propóleos de Alemania e Italia son los más efectivos contra las especies de *Candida spp.* aisladas de pacientes venezolanas; la información generada es valiosa y refuerza la escasa data que sobre este aspecto se tiene de Venezuela; además se requiere de estudios que incluyan mayor número de cepas por especie y de extractos etanólicos de propóleos procesados por los investigadores; finalmente que las investigaciones deben dirigirse hacia la identificación de los compuestos del propóleos responsables de la actividad biológica y su mecanismo de acción debido a los múltiples beneficios y propiedades medicinales que se le atribuye, más de 20, y particularmente porque se sabe son más asimilables que los antimicóticos convencionales y mejoran la reacción inmunológica del organismo, convirtiéndolos en excelentes candidatos para el tratamiento de la micosis en humanos.

Referencias

- [1] M. Quintero-Mora, A. Londoño-Orozco, F. Hernández-Hernández, P. Manzano-Gayosso, R. López-Martínez, C. Soto-Zarate, L. Carrillo-Miranda, G. Penieres-Carrillo, C. García-Tovar, and T. Cruz-Sánchez, "Efecto de extractos de propóleos mexicanos de *Apis mellifera* sobre el crecimiento *in vitro* de *Candida albicans*," *Rev Iberoam Micol*, vol. 25, pp. 22-26, 2008.
- [2] S. Falcão, N. Vale, P. Cos, P. Gomes, C. Freire, L. Maes, and M. Vilas-Boas, "In Vitro Evaluation of Portuguese Propolis and Floral Sources for Antiprotozoal, Antibacterial and Antifungal Activity," *Phytother Res*, vol. 28, no. 3, pp. 437-443, 2014.
- [3] A. Hegazi, F. Abd El Hady, and F. Abd Allah, "Chemical composition and antimicrobial activity of European propolis," *Z Naturforsch [C]*, vol. 55, no. 1-2, pp. 70-75, 2000.
- [4] J. Sforcin, A. Fernandes Jr, C. Lopes, V. Bankova, and S. Funari, "Seasonal effect on Brazil propolis antibacterial activity," *J Ethnopharmacol*, vol. 73, pp. 243-249, 2000.
- [5] M. Marcucci, F. Ferreres, C. García-Viguera, V. Bnkova, S. de Castro, and A. Dantas, "Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities," *J Ethnopharmacol*, vol. 74, no. 2, pp. 105-112, 2001.
- [6] V. Bankova, M. Popova, S. Bogdanov, and A. Sabatini, "Chemical composition of European propolis: Expected and unexcepted results," *Z Naturforsch [C]*, vol. 57, pp. 530-533, 2002.
- [7] R. Farre, I. Frasset, and A. Sánchez, "El propolis y la salud". *Ars Pharmaceutica*, vol. 45, no. 1, pp. 21-43, 2004.
- [8] R. Medellín-Pico, B. Correa, and A. Pérez, "Los beneficios del propóleos," *Rev Apitec*, vol. 60, pp. 3-10, 2007.
- [9] A. Manrique, and W. Santana, "Flavonoides, actividad antibacteriana y antioxidante de propóleos de abejas sin aguijón, *Melipona quadrifasciata*, *Melipona compressipes*, *Tetragonisca angustula* y *Nannotrigona sp.* De Brasil y Venezuela," *Zootecnia Trop*, vol. 26, no. 2, pp. 157-166, 2008.
- [10] M. Carbajal, "Antimicrobial effects of calcium hydroxide, chlorhexidine, and propolis on *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*," *J Invest Clin Dent*, vol. 5, no. 3, pp. 194-200, 2014.
- [11] A. Londoño, J. Penieres, C. García, L. Carrillo, M. Quintero, S. García, M. Mendoza, and T. Cruz, "Estudio de la actividad antifúngica de un extracto de propóleos de la abeja *Apis mellifera* proveniente del estado México," *Tecnología en Marcha*, vol. 21, no. 1, pp. 49-55, 2008.
- [12] C. Herrera, "The antifungal of six comercial extracts of chilean propolis on *Candida spp.*," *Cien Inv Agr*, vol. 37, no. 1, pp. 75-84, 2010.
- [13] F. Mayta-Tovalino, S. Sacsquispe, J. Ceccarelli, and J. Alania, "Propóleos peruanos: Una nueva alternativa terapéutica antimicrobiana en Estomatología," *Rev Estomatil Herediana*, vol. 22, no. 1, pp. 50-58, 2012.
- [14] A. Khosravi, H. Shokri, D. Nikaein, P. Mansouri, A. Erfanmanesh, R. Chalangari, and M. Katalin, "Yeasts as important agents of onychomycosis: *in vitro* activity of propolis against yeasts isolated from patients with nail infection," *J Altern Complement Med*, vol. 19, no. 1, pp. 57-52, 2013.

- [15] H. Koo, P. Rosalen, J. Cury, Y. Park, M. Ikegaki, and A. Sattler, "Effect of *Apis mellifera* L. Propolis from two brasilian regions on caries development in desalivated rats," *Caries Research*, vol. 33, pp. 393-400, 1999.
- [16] M. Popova, V. Bankova, S. Spassov, I. Tsvetkova, C. Naydenski, M. Silva, and M. Tsartsarova, "New bioactive chalcones in propolis from El Salvador," *Z Naturforsch [C]*, vol. 56, pp. 593-596, 2001.
- [17] P. Güler, K. Sorkun, and B. Salih, "The effect of some Turkish propolis on the product quantity of *Agaricus bisporus* (Lange.)," *Pak J Bot*, vol. 35, pp. 437-445, 2004.
- [18] K. Salomao, A. Dantas, C. Borba, L. Campos, D. Machado, F. Aquino, and S. de Castro, S. "Chemical composition and microbicidal activity of extracts from brazilian and Bulgarian propolis," *Lett Appl Microbiol*, vol. 38, pp. 87-92, 2004.
- [19] A.Ugur, and T. Arslan, "An in vitro study on antimicrobial activity of propolis from Mugla province of Turkey," *J Med Food*, vol. 7, pp. 90-94, 2004.
- [20] M. Mendoza, "Importancia de la Identificación de Levaduras," *Rev Soc Ven Microbiol*, vol. 25, pp. 13-21, 2005.
- [21] A.Sotero, L. Rodríguez, R. Barroso, N. de Araujo, R. Marinho, S. Abreu, R. Peixoto, and B. de Vasconcelos, "Antifungal activity of propolis against *Candida* species isolated from cases of chronic periodontitis," *Braz Oral Res*, vol. 29, no. 1, pp. 1-6, 2015.
- [22] A.Sawaya, A. Palma, F. Caetano, M. Marcucci, I da Silva Cunha, C. Araujo, and M. Shimizu, "Comparative study of in vitro methods used to analyse the activity of propolis extracts with different compositions against species of *Candida*," *Lett Appl Microbiol*, vol. 35, pp. 203-207, 2002.
- [23] A Espinel-Ingroff, A. Fothergill, J. Peter, M. Rinaldi, and T. Walsh, "Testing conditions for determination of minimum fungicidal concentrations of new and established antifungal agents for *Aspergillus* spp.: NCCLS Collaborative Study," *J Clin Microbiol*, vol. 40, no. 9, pp. 3204-3208, 2002.
- [24] A. Kujumgiev, I. Tsvetkova, Y. Serkedjieva, V. Bankova, R. Christov, and S. Popov, "Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin," *J Ethnopharmacol*, vol. 64, pp. 235-240, 1999.
- [25] G. de Souza, L. Pfenning, F. de Moura, M. Salgadam, and J. Takahashi, "Isolation, identification and antimicrobial activity of propolis-associated fungi," *Nat Prod Res*, vol. 27, no.18, pp.1705-1707, 2013.
- [26] H. Zhang, G.Wang, T. Beta, and J. Dong, "Inhibitory properties of aqueous ethanol extracts of propolis on alpha-glucosidase," *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015. [Online]. Available: doi: 10.1155/2015/587383, 2015.
- [27] N. Rojas, and S. Lugo, "Efecto antifúngico del propóleos sobre cepas del género *Candida*. Memorias del I Simposio sobre los Efectos del Propóleos en la Salud Humana y Animal," *Varadero, Cuba*, 1998, pp.42-53.
- [28] C. Ota, C. Unterkircher, V. Fantinato, and M. Shimizu, "Antifungal activity of propolis on different species of *Candida*," *Mycoses*, vol. 44, pp. 375-378, 2001.
- [29] J. Bonvehí, and A. Gutiérrez, "The antimicrobial effects of propolis collected in different regions in the Basque Country (Northern Spain)," *World J Microbiol Biotechnol*, vol. 28, no. 4, pp. 1351-1358, 2012.
- [30] M. Pfaller, M. Rinaldi, J. Galgiani, M. Bartlett, B.Body, A. Espinel-Ingroff, R. Fromtling, G. Hall, C. Hughes, F. Odds ,and A. Sugar, "Collaborative investigation of variables in susceptibility testing of yeasts," *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 34, pp.1648-1654, 1990.
- [31] L. Tolosa, and E. Cañizares, "Obtención, caracterización y evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos de Campeche," *Ars Pharmaceutica*, vol. 43, no. 1-2, pp. 187-204, 2002.
- [32] S. Silici, and S. Kutluca, "Chemical composition and antibacterial activity of propolis colleted by three different races of honeybees in the same region," *J Ethnopharmacol*, vol. 99, pp. 69-73, 2005.
- [33] R. Martins, E. Pereira, S. Lim Jr, M. Senna, R. Mesquina, and V. Santos, "Effect of comercial etanol propolis extract on the in vitro growth of *Candida albicans*," *J Oral Sci*, vol. 44, no. 1, pp. 41-48, 2002.
- [34] G. González, "Avances y perspectivas del propóleos en la salud humana. Ensayo. Memorias de apicultura". Organización Nacional de Apicultures Mazatlán, Sinaloa, 2007.
- [35] H. Shokri, A. Khosravi, and R. Yalfani, "Antifungal efficacy of propolis against fluconazole-resistant *Candida glabrata* isolates obtained from women with recurrent vulvovaginal candidiasis," *Int J Gynaecol Obstet*, vol. 114, no. 2, pp. 158-159, 2011.
- [36] M. Gil, A. Perelli, R. Alvarado, Y. Arias, and E. Blumenthal, "Actividad bacteriostática y bactericida de la tintura de propóleos sobre bacterias enteropatógenas," *Salus*, vol. 16, no 3, pp. 29-37, 2012.
- [37] M. Isla, Y. Dantur, A. Salas, C. Danert, C. Zampini, M. Arias, R. Ordóñez, L. Maldonado, E. Bedascarrasbure, and M. Nieva, "Effect of seasonality on chemical composition and antibacterial and anticandida activities of Argentine propolis. Design of a topical formulation," *Nat Prod Commun*, vol. 7, no. 10, pp.1315-1318, 2012.

- [38] N. Ngatu, T. Saruta, R. Hirota, M. Eitoku, N. Luzitu, B. Muzembo, T. Matsui, and M. Sukanuma, "Brazilian green propolis extracts improve *Tinea pedis interdigitalis* and *Tinea corporis*," *J Altern Complement Med*, vol. 18, no. 1, pp. 8-9, 2012.
- [39] R. Pereira, J. Ribeiro, T. Stivalet, and M. Bruschi, "Preparation and characterization of mucoadhesive thermo-responsive systems containing propolis for the treatment of vulvovaginal candidiasis," *J Pharm Sc*, vol. 102, no. 4, pp. 1222-1234, 2013.