



UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Investigación de Biocompuestos Polifenólicos con
Potencial Antimicrobiano para el Diseño y Desarrollo
de Productos de Aplicación en Biomedicina

D^a Alejandra Argüelles Prieto

2020



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D. FRANCISCO SOLANO MUÑOZ, Catedrático de Universidad del Área de BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR en el Departamento de BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR B E INMUNOLOGÍA, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "INVESTIGACIÓN DE BIOCOPUESTOS POLIFENÓLICOS CON POTENCIAL ANTIMICROBIANO PARA EL DISEÑO Y DESARROLLO DE PRODUCTOS DE APLICACIÓN EN BIOMEDICINA", realizada por D^a. ALEJANDRA ARGÜELLES PRIETO, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 9 de julio de 2020



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D. CRISTÓBAL BELDA INIESTA, DOCTOR EN MEDICINA Y CIRUGÍA POR LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID Y SUBDIRECTOR GENERAL DEL INSTITUTO DE SALUD CARLOS III, O.A., M.P, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "INVESTIGACIÓN DE BIOCOMPUESTOS POLIFENÓLICOS CON POTENCIAL ANTIMICROBIANO PARA EL DISEÑO Y DESARROLLO DE PRODUCTOS DE APLICACIÓN EN BIOMEDICINA", realizada por D^a. ALEJANDRA ARGÜELLES PRIETO, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Madrid, a 15 de Julio de 2020



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D^a. RUTH SÁNCHEZ-FRESNEDA PINTO, Doctora de Universidad del Área de MICROBIOLOGÍA en el Departamento de GENÉTICA Y MICROBIOLOGÍA, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "INVESTIGACIÓN DE BIOCOPUESTOS POLIFENÓLICOS CON POTENCIAL ANTIMICROBIANO PARA EL DISEÑO Y DESARROLLO DE PRODUCTOS DE APLICACIÓN EN BIOMEDICINA", realizada por D^a. ALEJANDRA ARGÜELLES PRIETO, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 15 de Julio de 2020

Parte de los resultados contenidos en la presente Memoria de Tesis Doctoral han sido objeto de la siguiente publicación científica:

A. Argüelles, R. Sánchez-Fresneda, JP. Guirao-Abad, C. Belda, JA. Lozano, F. Solano and JC. Argüelles. "Novel bi-factorial strategy against *Candida albicans* viability using carnosic acid and propolis: synergistic antifungal action". *Microorganisms* **2020**, 8, 749.

Igualmente, algunos de los resultados obtenidos han sido objeto de las siguientes patentes:

Patent No.: 3272344. Título: "Synergistic composition comprising propolis and carnosic acid for use in the prevention and treatment of candidiasis". EPO (European Patent Office). Fecha de concesión: 31/01/2019.

Patent No.: US10,272,120 B2. Título: "Synergistic composition comprising propolis and carnosic acid for use in the prevention and treatment of candidiasis". USPTO Fecha de concesión: 30/04/2019.

Patent No.: 2975047. Título: "Synergistic composition comprising propolis and carnosic acid for use in the prevention and treatment of candidiasis". CIPO. Fecha de concesión: 25/06/2019.

Patent No.: 3278798. Título: "Synergistic composition comprising propolis and carnosic acid for use thereof in treating and preventing infections caused by species of the *Cryptococcus neoformans* fungus". EPO. Fecha de concesión: 10/01/2019.

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

Esta Tesis Doctoral es fruto de un largo camino que he recorrido junto a muchas personas y su esencia impregna indeleblemente este trabajo formando un crisol caleidoscópico. Algunos estuvieron presentes desde la concepción de esta Tesis, otros se cruzaron a medio camino y también hubo quien recorrió fugazmente el sendero trazado ahora en estas páginas. A todos, gracias.

Expresar mi más sincera gratitud a mis directores de Tesis los Doctores D. Francisco Solano Muñoz, D. Cristóbal Belda Iniesta y Dña. Ruth Sánchez-Fresneda Pinto, por guiarme en la realización de la presente Tesis Doctoral, por su infinita comprensión e implicación. Ha sido un placer y un honor haber podido trabajar con ustedes. Son innumerables los conocimientos que he atesorado a su lado, y no solo dentro del ámbito científico.

A D. José Antonio Lozano Teruel, por ser referente dentro y fuera de la Ciencia, por su apoyo, por sus siempre sabios consejos y su excelente disposición. Gracias por su altruismo y su sensibilidad.

A D. Manuel Abadía Vicente y D. Ángel Tomás Martín, presidentes de Vitalgaia España, SL., por ser ejemplos de honestidad, valentía y superación, sin cuyo interés por el fomento de la Ciencia probablemente hoy no estaría escribiendo estas palabras. Su filantropía y mecenazgo no tienen parangón en la sociedad actual.

A José Pedro Guirao y a María Luz Muñoz por su ayuda desinteresada, por acogerme en el equipo y hacer de las jornadas de laboratorio un espacio donde trabajar, aprender y compartir pensamientos, sueños e inquietudes.

A mis padres, por vuestro apoyo y confianza, vuestros consejos y vuestro amor, por empujarme un poquito más en mis metas, por hacerme ver que estamos juntos en todo. Gracias por los valores que me habéis inculcado, sois sin duda un espejo donde mirarme. A mi hermana Raquel, por quererme por encima de todo, por compartir tantos momentos vitales. A María José, por ser, por estar, por empezar, por querer, por vivir, por encender e iluminar. A Bimba por tu amor fiel e incondicional, por regalarme felicidad solo con tu presencia. Tera, gracias por tus momentos únicos y divertidos.

“Caminante no hay camino, se hace camino al andar.

Caminante no hay camino, sino estelas en la mar.”

Antonio Machado

“Never cruel or cowardly. Never give up, never give in.”

Doctor Who

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

- **AmB** Anfotericina B
- **ATCC** American Type Culture Collection
- **CA** Ácido carnósico (extracto romero 72% de pureza en ácido carnósico)
- **CA92** Ácido carnósico (extracto romero 92% de pureza en ácido carnósico)
- **COL** Carnosol
- **Ct** Umbral de ciclo
- **DNA** Ácido desoxirribonucleico
- **DO₆₀₀** Densidad óptica a 600 nm de longitud de onda
- **EtOH25, EtOH50, EtOH75 y EtOH100** Fracciones de P3 separadas utilizando concentraciones de etanol 25, 50, 75 y 100%
- **EtOH55, EtOH60, EtOH65, EtOH70 y EtOH75(2)** Subfracciones de P3 separadas utilizando concentraciones de etanol 55, 60, 65, 70 y 75%
- **EUCAST** European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
- **G8, G8A, G8B-V, G10 y G10B** Geles formulados con CA y P3 como ingredientes activos
- **HPLC** Cromatografía líquida de alta resolución
- **LC/MS** Cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas
- **LD₅₀** Dosis letal media
- **M** Gel dental con CA(1%) y P3 (2%)
- **MIC** Concentración Mínima Inhibitoria
- **P2 y P3** Propóleos originarios de China
- **P5** Propóleo originario de España
- **PCR-RT** Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
- **rpm** Revoluciones por minuto
- **S** Combinación de CA y P3
- **UFC** Unidades Formadoras de Colonias (CFU en inglés)

- **X, Y, Z** Compuestos de P3 potencialmente responsables de su acción antifúngica
- **YPD** Extracto de levadura, peptona y glucosa
- **Z(1), Z(2) y Z(3)** Extractos comerciales del compuesto Z
- **Z1*** Z(1) enriquecido en Z

INDICE

ÍNDICE

| | | |
|-------|--|----|
| 1. | ANTECEDENTES | 1 |
| 1.1 | LAS INFECCIONES POR HONGOS Y LA TERAPIA ANTIFÚNGICA..... | 1 |
| 1.1.1 | Biología de <i>Candida albicans</i> | 2 |
| 1.1.2 | Epidemiología de <i>Candida albicans</i> | 5 |
| 1.1.3 | Incidencia específica de <i>Candida albicans</i> en clínica | 8 |
| 1.1.4 | Otros hongos examinados. Biología general de <i>Cryptococcus</i> | 10 |
| 1.1.5 | Importancia clínica de <i>Cryptococcus</i> | 11 |
| 1.2 | ANTIFÚNGICOS DE APLICACIÓN CLÍNICA..... | 13 |
| 1.2.1 | Polienos | 14 |
| 1.2.2 | Equinocandinas..... | 15 |
| 1.2.3 | Azoles | 16 |
| 1.2.4 | Otros antifúngicos | 17 |
| 1.3 | PRINCIPIOS ACTIVOS DE ORIGEN NATURAL: ÁCIDO CARNÓSIDICO..... | 18 |
| 1.3.1 | Generalidades..... | 18 |
| 1.3.2 | Propiedades biológicas estabilidad y toxicidad..... | 20 |
| 1.3.3 | Propiedades antioxidantes y aplicaciones biotecnológicas | 21 |
| 1.4 | PRINCIPIOS ACTIVOS DE ORIGEN NATURAL: PROPÓLEOS | 24 |
| 1.4.1 | Generalidades..... | 24 |
| 1.4.2 | Composición | 26 |
| 1.4.3 | Tipos de propóleos..... | 33 |
| 1.4.4 | Propiedades biológicas | 35 |
| 2. | OBJETIVOS..... | 43 |
| 3. | MATERIALES Y MÉTODOS | 47 |
| 3.1 | MATERIALES | 47 |
| 3.1.1 | Bacterias | 47 |
| 3.1.2 | Levaduras | 47 |
| 3.1.3 | Extractos naturales..... | 48 |
| 3.1.4 | Medios de cultivo..... | 51 |
| 3.1.5 | Geles dentales | 52 |
| 3.2 | MÉTODOS | 54 |

| | | |
|--------|---|-----|
| 3.2.1 | Antibiogramas | 54 |
| 3.2.2 | Turbidimetría | 55 |
| 3.2.3 | Ensayo de viabilidad..... | 55 |
| 3.2.4 | Ensayo de sensibilidad: formación de colonias macroscópicas en medio sólido..... | 56 |
| 3.2.5 | Ensayos de filamentación en medio líquido | 57 |
| 3.2.6 | Microscopía óptica | 57 |
| 3.2.7 | Determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) de diferentes antifúngicos..... | 58 |
| 3.2.8 | Separación de fases del propóleo en columna (SPE)..... | 59 |
| 3.2.9 | Obtención de los compuestos de cada fracción de propóleo P3..... | 61 |
| 3.2.10 | Análisis HPLC | 62 |
| 3.2.11 | Análisis LC/MS..... | 63 |
| 3.2.12 | Enriquecimiento del extracto comercial de Z (Z1*) | 64 |
| 3.2.13 | Soporte bioinformático, representación gráfica de los resultados y tratamiento estadístico de los datos | 64 |
| 4. | RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 69 |
| 4.1 | ENSAYOS PRELIMINARES DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL PROPÓLEO Y EL CA MEDIANTE ANTIBIOGRAMAS EN PLACA | 70 |
| 4.1.1 | Bacterias | 70 |
| 4.2 | MEDIDAS CUANTITATIVAS DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE PROPÓLEO Y ÁCIDO CARNÓSIDICO | 78 |
| 4.2.1 | Ensayos sobre <i>Candida albicans</i> | 78 |
| 4.2.2 | Ampliación del estudio a otros hongos: <i>Cryptococcus neoformans</i> | 88 |
| 4.2.3 | Estudio de actividad antifúngica de la combinación de P3 y CA sobre <i>Candida albicans</i> | 92 |
| 4.2.4 | Ampliación del estudio de la actividad antifúngica de P3 y CA combinados sobre otros hongos: <i>Cryptococcus neoformans</i> | 100 |
| 4.2.5 | Estudios complementarios sobre otros hongos: efecto antifúngico en <i>Candida glabrata</i> | 104 |
| 4.2.6 | Breve estudio de otros productos comerciales con base de propóleo | 111 |
| 4.2.7 | Análisis sobre las implicaciones del sinergismo..... | 113 |
| 4.2.8 | Formulación de posibles mecanismos sinérgicos de los compuestos identificados en P3 y CA. | 117 |

| | | |
|--------|--|-----|
| 4.3 | ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN DEL PROPÓLEO E INVESTIGACIÓN DE SUS POSIBLES COMPUESTOS ACTIVOS..... | 118 |
| 4.3.1 | Análisis cromatográfico de los propóleos utilizados..... | 119 |
| 4.3.2 | Fraccionamiento del propóleo P3 y ensayos de actividad..... | 122 |
| 4.3.3 | La sinergia con CA tras el fraccionamiento..... | 127 |
| 4.3.4 | Relación actividad-concentración: la concentración umbral..... | 131 |
| 4.3.5 | Actividad de EtOH75 sobre <i>C. neoformans</i> | 132 |
| 4.3.6 | Subfraccionamiento del P3..... | 133 |
| 4.3.7 | Ensayos de actividad antifúngica con las subfracciones de P3..... | 135 |
| 4.3.8 | Ensayos sobre otros hongos: <i>C. glabrata</i> y <i>C. neoformans</i> | 143 |
| 4.3.9 | Recopilación de las principales conclusiones del fraccionamiento..... | 146 |
| 4.3.10 | Análisis LC/MS de las fracciones más activas de P3..... | 148 |
| 4.3.11 | Identificación y estudio de los posibles compuestos activos de P3..... | 149 |
| 4.3.12 | Cinética y durabilidad de la acción antifúngica del potencial compuesto activo del propóleo y de sus preparaciones comerciales..... | 156 |
| 4.5 | Aplicaciones industriales de la combinación de P3 y CA: gel dental..... | 164 |
| 4.5.1 | Ensayos de actividad y estabilidad <i>in vitro</i> | 164 |
| 4.5.2 | Ensayo de intervención biomédica en humanos con el gel dental..... | 171 |
| 4.5.3 | Estudio de viabilidad comercial..... | 177 |
| 5. | CONCLUSIONES..... | 188 |
| 6. | BIBLIOGRAFÍA..... | 194 |

ANTECEDENTES

1. ANTECEDENTES

1.1 LAS INFECCIONES POR HONGOS Y LA TERAPIA ANTIFÚNGICA

En las últimas dos décadas se ha producido un aumento de la incidencia de micosis, especialmente en sectores de población con un estado de salud más vulnerable, como son las personas inmunocomprometidas u hospitalizadas por serios trastornos de la salud, pacientes con enfermedades crónicas tales como el SIDA y neoplasias, neonatos o las personas de avanzada edad. Esto conlleva serias complicaciones que en el peor caso puede conllevar riesgo mortal (1).

Las micosis con mayor incidencia en la actualidad son las Candidiasis producidas por levaduras del género *Candida* como *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* o *C. krusei*; Aspergilosis causadas por hongos del género *Aspergillus*, como son: *A. fumigatus*, *A. flavus* y *A. ustus*; Histoplasmosis producida por el hongo *Histoplasma capsulatum*, o Criptococosis (meningitis criptocócica) producida por el basidiomiceto *Cryptococcus neoformans* (2).

Tabla 1.1. Principales tipos de micosis humanas y su tasa de prevalencia clínica.

| Micosis | Casos de micosis (millones por año) | | | | |
|-----------------------|-------------------------------------|-----------|-------|-------|-------|
| | 1980-1982 | 1992-1993 | 1996 | 2000 | 2003 |
| Candidiasis | 2,6 | 72,8 | 228,2 | 100,0 | 290,0 |
| Histoplasmosis | 13,9 | 7,1 | 13,6 | NA | NA |
| Aspergilosis | 8,4 | 12,4 | 34,3 | NA | 22,0 |
| Criptococosis | 4,0 | 65,5 | 29,6 | 13,0 | NA |

Fuente: (2)

Paralelamente, se está produciendo una pérdida de eficacia de los antifúngicos aplicados, producida principalmente por el uso indiscriminado de este tipo de fármacos, que ha facilitado la adaptación de los microorganismos y la generación de nuevas resistencias. Además, el escaso número disponible de antifúngicos clínicos dificulta la alternancia entre

tratamientos, que al menos pudiera retrasar la aparición de nuevas resistencias. Solo existen tres familias principales de antifúngicos: los polienos, los derivados azólicos y las equinocandinas. Dentro de toda esta problemática, es preciso destacar que, en ciertos casos pueden darse interacciones entre ellos, provocando complicaciones para su eliminación y aumentando la vida media del fármaco en el organismo. También pueden provocar la aparición de efectos secundarios dañinos y de compuestos terciarios tóxicos (1). La base principal de todos estos inconvenientes radica en que los hongos son organismos eucariotas, lo que significa que comparten con las células humanas rutas metabólicas importantes y moléculas clave, utilizadas como diana celular por los antifúngicos. Por ello, a pesar de que el antibiótico tenga más afinidad por las células fúngicas, las dosis terapéuticas a emplear posibilitan su interacción con dianas similares existentes en células de mamíferos y el daño consiguiente sobre las células humanas.

1.1.1 Biología de *Candida albicans*

El género *Candida* pertenece al reino de los hongos o reino “Fungi” (fúngico). La especie fue denominada así por la micóloga holandesa Christine M. Berkhout (1923), aunque ya fue observada en 1839, por Langenbeck en forma de placas blanquecinas y abscesos en las mucosas y órganos de cadáveres. Gruby consiguió su aislamiento y cultivo sobre rodajas de patatas en 1842, llamándola *Oidium albicans*.

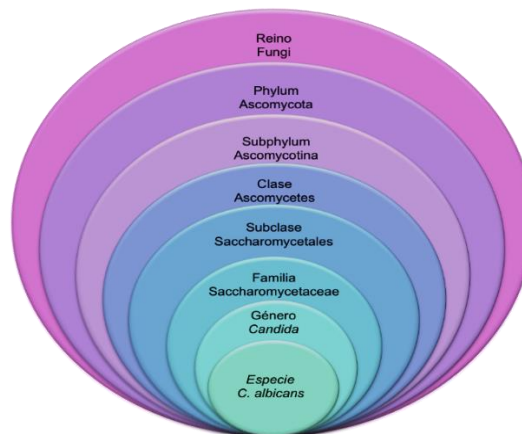


Figura 1.1. Posición taxonómica de *Candida albicans*.

Fuente: (3)

C. albicans es un hongo tradicionalmente encuadrado entre los Deuteromicetos, hongos imperfectos por carecer de verdadero ciclo de reproducción sexual. Sin embargo, recientemente su posición taxonómica se ha redefinido como un hemiascomiceto, dentro del orden Saccharomycetales, perteneciendo a la familia Saccharomycetaceae (Figura 1.1). *C. albicans* está muy relacionada con la levadura de gemación *Saccharomyces cerevisiae*, aunque ambas especies divergen en más de 900 millones de años, una divergencia similar a la que ocurre entre los humanos y los peces (4). Agrupa células mesófilas, de forma ovoide, cilíndrica o alargada. En medios comunes forma colonias blancas o ligeramente ocreas debido a pigmentos carotenoides. Considerado como un diploide permanente, estudios recientes revelan la existencia en *C. albicans* de estadios parasexuales, que posibilitan conjugaciones atípicas, pérdida de cromosomas o rápidas transiciones diploide-tetraploide (4). Algunos cambios son de naturaleza epigenética, inducibles por el medio ambiente, y son importantes en la formación y desarrollo de biofilms, esenciales en el desarrollo de procesos infectivos.

La mayoría de las especies del género *Candida* pueden vivir formando parte de la flora cutánea, al ser saprofitas. Sin embargo, *C. albicans* es el patógeno de mayor prevalencia en humanos (2). Sin reservorio ambiental conocido, su adquisición tiene lugar mediante transmisión materno-fetal durante o inmediatamente después del nacimiento (5). Puede permanecer como un comensal asintomático y así podemos encontrarla en la cavidad oral, en el tracto gastrointestinal y en la vagina, suponiendo del 50 al 80% de la microbiota. Las candidiasis abarcan desde infecciones superficiales, de buen pronóstico hasta cuadros sistémicos potencialmente mortales, siendo el estado inmunodepresivo del paciente y su capacidad de respuesta el factor determinante de la gravedad. De hecho, algunos estudios sugieren que el desarrollo de una infección productiva es el resultado de la integración entre el agente virulento, la respuesta inmunitaria del paciente y otros componentes de la microbiota (5).

Entre los principales factores de virulencia que median en la infección de *C. albicans* y la ulterior colonización del cuerpo humano se encuentran:

- **Adhesión celular y formación de biopelículas (biofilms).** Requiere la intervención de las adhesinas, proteínas presentes en blastoconidios e hifas de *C. albicans*, que una vez reconocido el hospedador se anclan a la superficie mediante diferentes enlaces. Las biopelículas son estructuras complejas que engloban un grupo de células embebidas por

una matriz extracelular autoproducida, rica en carbohidratos y proteínas, que las protege del sistema inmunitario y de los tratamientos antifúngicos, contribuyendo a mejorar su competitividad frente a células plantónicas, de vida libre (6).

• **Pared celular.** Constituye aproximadamente el 30% del peso seco de la célula y está constituida por:

- Estructura interna: formada por quitina y β -1,3-glucanos.
- Estructura externa: formada por mananos y proteínas.

Ambas capas permanecen unidas por el β -1,6-glucano conector, y el conjunto aporta rigidez y flexibilidad a la levadura, que contribuye al crecimiento y permite soportar estrés ambiental por cambios de tipo fisicoquímico.

- **Polimorfismo:** Morfológicamente *C. albicans* presenta una gran variedad de formas celulares según las condiciones ambientales: blastoconidios, pseudohifas, hifas y clamidiosporas. Dicha morfología está relacionada con su capacidad para invadir el cuerpo humano y provocar cuadros patológicos (7).

Como ya se ha comentado, para que se produzca una infección, además del patógeno, pueden intervenir causas debidas al hospedador o causas ambientales. Respecto del hospedador, se reconocen tres factores esenciales:

- Fisiológicos
- Genéticos
- Adquiridos (inmunodeprimidos, recién nacidos, diabetes, suministro de antibióticos o corticoides, etc.).

Entre los factores ambientales, debemos mencionar:

- La humedad
- El calor
- Grandes quemados
- La maceración crónica (de las comisuras de los labios en ancianos, prótesis dentales, marcapasos, etc.).

Como tratamiento preventivo recomendable para prevenir las candidiasis superficiales, se aconseja mantener una buena higiene, secar bien la piel, usar colutorios con flúor, o ingerir probióticos y derivados lácteos para favorecer la acidez de la flora vaginal.

1.1.2 Epidemiología de *Candida albicans*

Aunque *Candida albicans* es la especie infecciosa predominante, el género *Candida* incluye otras levaduras oportunistas que producen infecciones en el ser humano. Consideradas bajo la denominación genérica de “non-*albicans*”, su incidencia ha aumentado en las últimas décadas e incluye especies catalogadas como inocuas; las más representativas son las siguientes: *C. dubliniensis*, *C. famata*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis*, *C. rugosa* y *C. tropicalis* (8). Las candidiasis están consideradas como la cuarta causa de muerte en hospitales por infecciones nosocomiales en Estados Unidos de América. En el caso de *C. albicans*, la tasa de mortalidad es del 50% (9), y continua siendo la responsable de las infecciones fúngicas más graves en personas hospitalizadas de todo el mundo (10). Estudios multicéntricos llevados a cabo en diferentes centros, recogen datos referidos a las infecciones producidas por *Candida*, tal y como puede observarse en la Tabla 1.2 (8,11–13).

Tabla 1.2. Distribución de infecciones causadas por especies de *Candida*, según estudios multicéntricos globales efectuado entre 1997 y 2011. Datos expresados en porcentaje (%).

| Años | Descripción | C. <i>albicans</i> | C. <i>tropicalis</i> | C. <i>parapsilosis</i> | C. <i>glabrata</i> | C. <i>krusei</i> |
|-----------------------|------------------------|-------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|
| 1997 -2007 | Laboratorio ARTEMIS | 65,3 | 7,2 | 6 | 11,3 | 2,4 |
| | 1997-2000 | 70,9 | 5,4 | 4,8 | 10,2 | 2,2 |
| | 2001-2004 | 62,9 | 7,5 | 6,9 | 11,5 | 2,5 |
| | 2005-2007 | 65 | 8 | 5,6 | 11,7 | 2,5 |
| 2003 | Laboratorio SENTRY | 48,7 | 10,9 | 17,3 | 17,2 | 1,9 |
| 2008 -2009 | Laboratorio SENTRY | 48,4 | 10,6 | 17,1 | 18,2 | 2 |
| 2007 -2011 | Hospital: pediatría | 44 | | 22 | 11 | 3 |
| 1996 -2000 | Hospital Clinic | 47 | 16 | 18 | 13 | 4 |
| 2001 -2005 | Hospital Clinic | 46 | 13 | 20 | 7 | 6 |
| 2006 -2008 | Hospital Clinic | 54 | 13 | 14 | 12 | |

Fuente: Elaboración propia a partir de (8,11–13).

La transformación de un organismos inocuo en un patógeno virulento, es un proceso complejo (5). *C. albicans* vive como comensal en la piel y en la cavidad oral del 75% de la población sana, pero bajo ciertas circunstancias como es un sistema inmune deprimido se pueden sufrir infecciones fúngicas, como las candidiasis, más o menos recurrentes. Este tipo de infecciones, como los episodios vulvovaginales que padecen aproximadamente el 75% de las mujeres al menos una vez en la vida, son superficiales y no letales. Sin embargo, en los casos más graves (candidemias) pueden ser mortales, incluso con terapia antifúngica (9). Aunque los principales factores implicados son parcialmente conocidos, es preciso profundizar en los mecanismos de resistencia e investigar una terapia dirigida, basada en

el principio de toxicidad selectiva, para conseguir mayor eficacia con los máximos daños al patógeno y los mínimos efectos en el hospedador.

La distribución geográfica global de las especies de *Candida* es muy diferente según las zonas observadas (14). Así, mientras que su incidencia es similar en Europa y USA, predominando *C. albicans*, seguida de *C. glabrata* (Figura 1.2). En Australia, *C. parapsilosis* tiene una ligera supremacía sobre *C. glabrata*. En Latinoamérica y en ciertos lugares de Asia, como India o Pakistán, la distribución cambia por completo, siendo *C. tropicalis* la especie más abundante, seguida de *C. parapsilosis*, *C. glabrata* y en cuarto lugar *C. albicans* (15). Por tanto, los factores ambientales son determinantes en la prevalencia de la especie de *Candida* dominante en una región concreta.

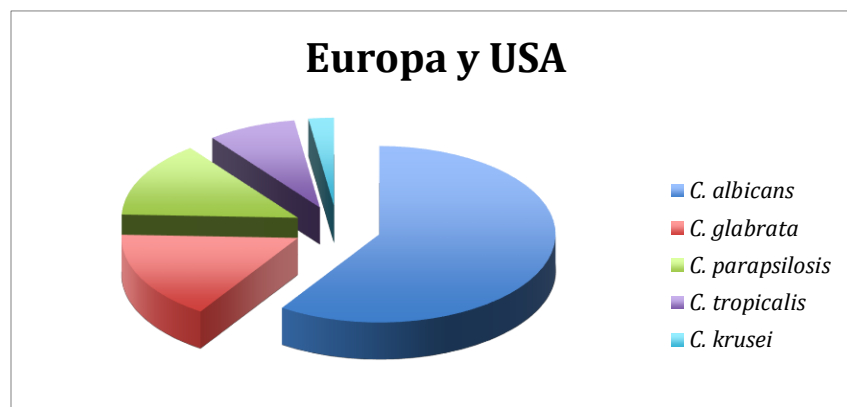


Figura 1.2. Distribución de las especies de *Candida* en Europa y USA (%)

Fuente: (13)

En España, un estudio realizado por FUNGEMYCA en los años 2009-2010 en 43 hospitales de todo el país sobre pacientes afectados de fungemia, resultó que *C. albicans* fue la especie más aislada. Tras ella, se encontró *C. parapsilosis* como la especie “non-albicans” más común, a diferencia de otros países europeos donde es *C. glabrata* (13).

Desde los años 90, se está produciendo una tendencia creciente de las candidemias en Europa, por lo que es cada vez más importante aislar e identificar la especie responsable y conocer sus mecanismos de virulencia (16). Es frecuente encontrar situaciones clínicas con varios microorganismos invadiendo al enfermo, dando lugar a cuadros de infecciones

múltiples. Esta situación también sucede con *Candida sp.*, en la denominada “candidemia mixta”. Según un estudio del proyecto CANDIPOP en diferentes hospitales españoles entre abril de 2010 y mayo de 2011, la mortalidad atribuible a candidemias mixtas durante la primera semana de admisión en hospitales. En este estudio se determinó que los casos de candidemia, debidos a *C. glabrata* eran bajos, mientras los causados por *C. parapsilosis* eran más numerosos (Figura 1.3), al contrario de lo que ocurre en Europa, lo que confirma los datos antes descritos (Figura 1.2).



Figura 1.3. Porcentaje de aislamientos clínicos detectados en España de distintas especies del género *Candida* según un estudio realizado por FUNGEMYCA (2009-2010).

Fuente: (17)

1.1.3 Incidencia específica de *Candida albicans* en clínica

Las infecciones microbianas eran la principal causa de mortalidad antes del descubrimiento de los antibióticos. De hecho, en algunos países en desarrollo, sin acceso a medicamentos de última generación, sigue siendo un importante problema médico. No obstante, el aumento de resistencia no depende exclusivamente de la patogénesis del microorganismo, sino de las inadecuadas prácticas terapéuticas seguidas por muchos sistemas sanitarios, incluyendo el caso de España, hasta convertirse en un problema de salud pública actual (18). Entre los microorganismos involucrados en el grave problema de la resistencia frente a antimicrobianos, se encuentra *C. albicans* (19). Como ya se ha indicado anteriormente, esta levadura oportunista puede ocasionar dos tipos de infecciones: candidiasis y candidemias:

- Candidiasis. La infección se presenta de forma superficial en:
 - Vagina
 - Cavidad oral (muguet)
 - Intestino o piel
- Candidemia: El huésped se encuentra muy debilitado y este patógeno oportunista se divide, entrando en el torrente sanguíneo a través de la pared intestinal donde libera sus toxinas. Una representación esquemática de las principales infecciones provocadas por *C. albicans*, así como las áreas del cuerpo humano afectadas, se muestra en la Figura 1.4.

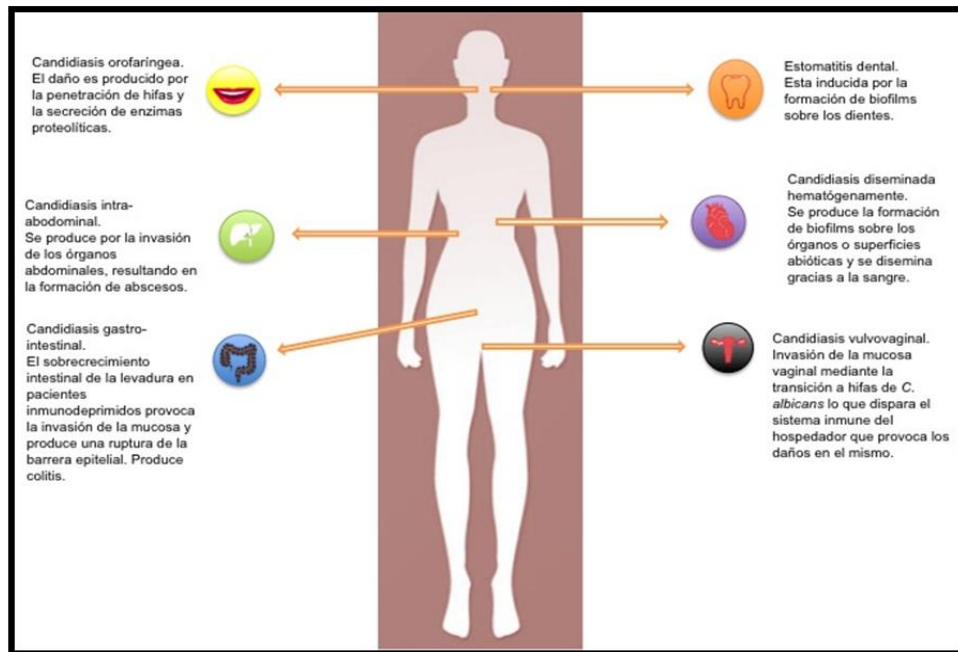


Figura 1.4. Ilustración mostrando las diferentes enfermedades que puede producir *C. albicans* sobre el cuerpo humano.

Fuente: dibujo adaptado de (5)

La sintomatología general en el caso de las candidiasis superficiales suele ser común a otras dermatomicosis, y de buen pronóstico, salvo complicaciones. Consiste en: piel enrojecida y ligeramente edematosa, prurito intenso (picor) y episodios de quemazón. En ocasiones, ni siquiera se requiere prescripción antibiótica para su tratamiento. Por el

contrario, los síntomas referidos a casos de candidiasis sistémica son más agresivos y dañinos para el organismo, siendo imprescindibles los tratamientos farmacológicos, como, por ejemplo: alergias excesivas, trastornos vaginales recurrentes, depresión, cansancio extremo, migrañas, insomnios, irritabilidad, pérdida transitoria de memoria, formación de gas e hinchazón abdominal. También se han descrito episodios de diarrea o estreñimiento, alteraciones del síndrome premenstrual, dolores en oídos y articulaciones, así como otra sintomatología más difusa.

***Candida auris*: un grave patógeno emergente.**

Aunque el trabajo experimental desarrollado en esta Tesis Doctoral se ha centrado esencialmente en *C. albicans* como modelo de ensayo, debemos mencionar siquiera brevemente a *Candida auris* por su importancia clínica. Actualmente, existe una alarma sanitaria global debido a la aparición de esta levadura patógena, una especie multirresistente con una capacidad intrínseca para generar resistencia a los antifúngicos actuales como Fluconazol, Anfotericina B e incluso las Equinocandinas (20). Presenta una gran tolerancia a estrés salino y térmico, a bajas concentraciones de detergentes y a numerosos antisépticos de uso hospitalario lo que ha permitido su supervivencia en este tipo de ambientes. Se transmite con gran facilidad, no sólo entre pacientes, sino a través de fómites y objetos inanimados. Su tasa mortalidad puede superar el 40% (21,22).

1.1.4 Otros hongos examinados. Biología general de *Cryptococcus*

Se trata de una levadura capsulada perteneciente a la clase Basidiomycetes, y el agente etiológico de la meningitis criptocócica, una micosis oportunista potencialmente grave en pacientes inmunodeprimidos, principalmente infectados con el VIH (SIDA), aunque también puede afectar a individuos inmunocompetentes (23). Incluye dos especies: *C. neoformans*, un microorganismo de distribución universal que se encuentra, sobre todo, en hábitats naturales procedente del guano de paloma, de las deyecciones de diferentes aves y murciélagos, y barrizales (24). La otra especie, *Cryptococcus gattii*, se aísla generalmente de áreas subtropicales o tropicales, aunque recientemente se han detectado casos en regiones más templadas, como algunas zonas del Pacífico Norte. Ambas especies tienen

una prevalencia notable en los países en vías de desarrollo (25). En contraste con la primera especie, ésta afecta con frecuencia a personas sanas, causando neumonía en la mayoría de los casos (26).

Presenta algunas características notables, como ser un basidiomiceto (mientras *C. albicans* es un ascomiceto), que sintetiza una enorme cápsula polisacárida externa rica en melanina. En la naturaleza abunda en los excrementos de palomas, el contagio ocurre mediante inhalación por vía respiratoria y, además de diversos cuadros respiratorios, causa una patología grave, la denominada meningitis criptocócica (21).

1.1.5 Importancia clínica de *Cryptococcus*

La patología más grave es la denominada meningitis (meningoencefalitis) criptocócica o criptococosis (27). El contagio se inicia por inhalación de los blastoconidios (formas levaduriformes) o esporas de *C. neoformans* y *C. gattii*, siendo el pulmón el primer órgano colonizado. Determinados serotipos tienen un mayor grado de virulencia y la evolución de la enfermedad depende de la respuesta inmune del huésped, siendo controlada en individuos sanos salvo complicaciones (28). Sin embargo, la levadura puede replicarse en el interior de los macrófagos, actuando como un reservorio y permaneciendo en estado latente durante años. En condiciones de inmunosupresión (principalmente con un descenso en el número de linfocitos T) se produce una colonización invasiva que conlleva la diseminación desde los pulmones a través del torrente sanguíneo y su alojamiento en el sistema nervioso central incluido el cerebro, donde causa meningitis y meningoencefalitis, resultando fatal si no es tratada adecuadamente.

Pese a constituir únicamente el 1% de todas las infecciones de criptococosis mundiales, *C. gattii* cobró gran importancia cuando se descubrió en 1999 que esta especie era el agente causante de un brote detectado en Vancouver, Canadá (29). Estas cepas infectivas se han extendido en la actualidad a otras regiones del Canadá y al Noroeste del Pacífico (30,31). Por ello, el estudio de la virulencia de *C. gattii* es un tema de gran interés para la comunidad científica.

La patogénesis de *Cryptococcus* se asocia a múltiples factores de virulencia, como la cápsula y la producción de melanina principalmente. El polisacárido capsular contiene un

alto porcentaje de glucuronoxylomanan (GXM), lo que impide la fagocitosis y la migración de leucocitos, y genera supresión de la proliferación de linfocitos T. La presencia de melanina evita la producción de factor de necrosis tumoral (TNF) por macrófagos, que es necesario para generar una respuesta inmune celular protectora (32). También presenta otras propiedades, como la producción de ureasa y fosfolipasas que le confieren cierta ventaja para su supervivencia en el interior del huésped. Aunque la morfogénesis es un rasgo común a muchos hongos patógenos, *Cryptococcus* no forma hifas ni pseudohifas, si bien durante la colonización *in vivo* experimenta cambios morfológicos relevantes en la morfología celular. Los principales son:

A) Ensanchamiento de la cápsula externa.

B) Crecimiento global de las células, dando lugar la formación de células “gigantes o titanes”. Los mecanismos moleculares involucrados en la regulación de estos procesos todavía no son del todo conocidos (32,33).

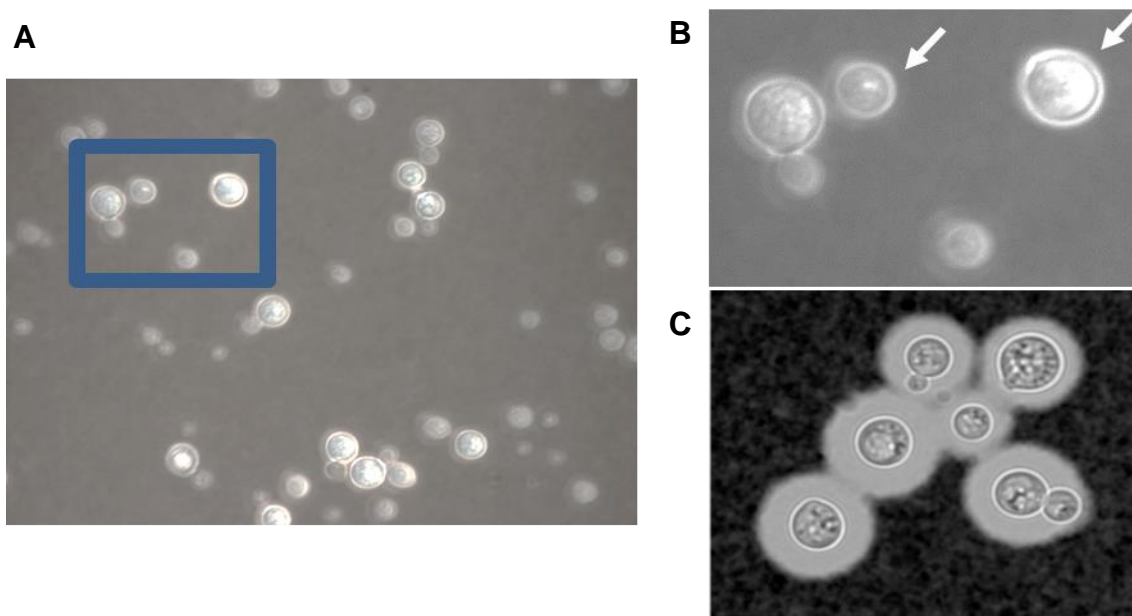


Figura 1.5. Visualización de la morfología externa de *Cryptococcus* mediante microscopía de contraste de fases (objetivo de 100X) Tinción en fresco de *C. neoformans* (A) junto con un campo óptico ampliado de algunas colonias (B, flechas). El detalle de la cápsula de *Cryptococcus* se obtuvo mediante tinción negativa (tinta china) de la preparación, como un halo alrededor del cuerpo celular por exclusión de la tinta china.

Fuente: Imagen cedida por el Dr. O. Zaragoza, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda.

Las infecciones producidas por *C. neoformans* han sido una importante causa de morbilidad y mortalidad en pacientes VIH, ya que entre el 5-10% de los individuos con linfopenia CD4⁺ desarrollaron criptococosis a finales del siglo XX. Aunque la incidencia de criptococosis ha disminuido significativamente en los países desarrollados gracias a la introducción de la terapia antirretroviral con alta actividad (HAART), la mortalidad asociada sigue siendo elevada (34–40). En regiones en vías de desarrollo, la incidencia de la criptococosis está lejos de estar controlada, estimándose en 720.000 nuevos casos al año en el África subsahariana y 120.000 en el sudeste asiático (41). En estas zonas, junto con Latinoamérica y el Caribe, la mortalidad oscila entre el 55-70%, ascendiendo el número anual de muertes a más de 650.000 personas.

1.2 ANTIFÚNGICOS DE APLICACIÓN CLÍNICA

En la actualidad, se dispone de tres familias principales de antifúngicos usados en la práctica clínica. El mecanismo fundamental de toxicidad antifúngica responde a dos tipos o acciones diferentes:

- **Acción fungistática:** el compuesto impide el crecimiento celular y la expansión del patógeno por el cuerpo, de tal forma que en ese estado es el sistema inmunológico el que se encarga de erradicar la infección.
- **Acción fungicida:** es el propio compuesto el que mata directamente al microorganismo patógeno provocando la lisis irreversible de las células y, por tanto, deteniendo la infección.

Hay que tener en cuenta que ambos efectos, fungistático y fungicida, no son excluyentes y se pueden dar con el mismo producto, con sólo variar la concentración o la vía de aplicación del mismo. De hecho, algunos compuestos serán fungistáticos a bajas concentraciones y fungicidas a altas dosis (42,43).

1.2.1 Polienos

Son moléculas naturales sintetizadas por *Streptomyces nodosus* que presentan un fuerte carácter anfipático debido a la presencia de una región hidrófila y otra hidrófoba (Figura 1.6A). La molécula contiene un anillo macrólido cerrado por una lactona. Posee además la micosamina, un aminoazúcar unido al carbono C19 del anillo macrólido y un grupo carboxilo unido al carbono C16. Estos componentes y la presencia de varios grupos hidroxilo le confieren su naturaleza anfipática frente a la cadena poliénica que constituye la parte hidrófoba y es la cara de interacción con el ergosterol de la membrana de la célula fúngica durante el mecanismo de acción (Figura 1.6B). Los polienos son el grupo que posee el espectro más amplio de actividad antifúngica. Dentro de ellos, los más utilizados son la Anfotericina B (AmB), obtenida de *Glarea lozoyensis* y la Nistatina (43).

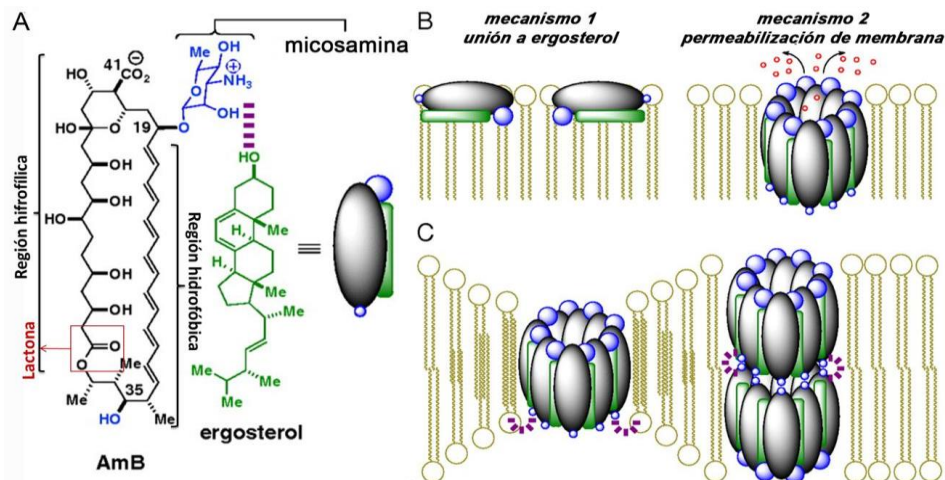


Figura 1.6. Estructura química (A) y mecanismos de acción (B) de la Anfotericina B sobre el ergosterol de la membrana plasmática.

Fuente: adaptada de (44).

El mecanismo de acción de los polienos está relacionado con su capacidad de unión al ergosterol, presente en la membrana plasmática en hongos, equivalente al colesterol de animales. La formación de complejos entre el polieno y el ergosterol altera la permeabilidad de la membrana, con la subsiguiente formación de poros y pérdida de agua y electrolitos

esenciales, provocando una descompensación osmótica que lleva finalmente a la muerte celular.

La toxicidad causada por la AmB se debe a la región hidrofóbica responsable de la unión al ergosterol. Esa región poliénica también tiene afinidad por el colesterol de células animales, ocasionando efectos secundarios como la nefrotoxicidad y hepatotoxicidad en las membranas de nefronas y hepatocitos. A pesar de su uso desde la década de 1950, la resistencia fúngica frente a AmB es muy rara (45–47). Para disminuir los efectos secundarios en el ser humano, se han preparado variaciones en la presentación clínica de la AmB, siendo la más efectiva la formulación liposomal, que produce menor nefrotoxicidad y mantiene su carácter antifúngico, aunque se debe inyectar por vía intravenosa (48).

1.2.2 Equinocandinas

Este grupo tiene una estructura compleja formada por un núcleo hexapeptídico y una cadena lateral acil lipídica (Figura 1.7), por lo que tienen en común con los polienos el carácter anfipático. Las equinocandinas básicas son producidas por diferentes microorganismos, aunque es usual su modificación química posterior de forma que se consideran agentes semisintéticos (49).

Su acción tiene como diana la pared fúngica, puesto que inhibe de modo no competitivo la enzima glucan sintetasa, responsable de la síntesis de 1,3- β -D-glucanos estructurales. El resultado es la desestructuración de la pared celular y la muerte de la célula fúngica (Figura 1.8). Tienen menos efectos adversos sobre el paciente que otros antifúngicos (16,46). En dosis moderadas actúan como fungistáticos ya que las levaduras no pueden renovar su pared, pero a altas concentraciones son fungicidas y pueden producir lisis celular (50). Las equinocandinas más destacadas son las Micafungina, Caspofungina y Anidulafungina, que se diferencian principalmente en la naturaleza y características de la cola hidrofóbica. Destacar que están aumentando los casos de resistencia (51). La Figura 1.7 muestra la estructura de la Micafungina, obtenida a través de modificaciones químicas del hexapéptido procedente del hongo *Coleophoma empetri*. Esta molécula ha sido ampliamente utilizada en los ensayos de laboratorio.

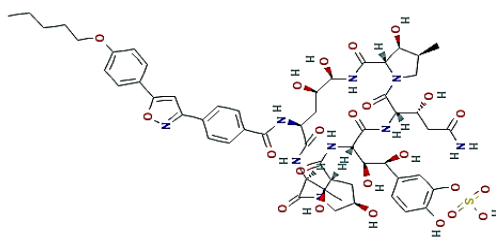


Figura 1.7. Estructura molecular de la Micafungina, equinocandina con amplia utilización en clínica (50).

Fuente: (52)

1.2.3 Azoles

Se trata de un grupo de moléculas sintéticas con actividad antifúngica y con un amplio espectro de actividad. La estructura base está formada por un anillo derivado del imidazol. Se clasifican en:

- Azoles de primera generación: con dos nitrógenos en su estructura. Los principales representantes de este grupo son el Ketoconazol y el Miconazol.
- Azoles de segunda generación: con tres nitrógenos en su estructura. En este grupo se encuentran el Itraconazol y Fluconazol, que se completa con nuevas moléculas derivadas de los anteriores como el Posaconazol (derivado del Itraconazol) y el Voriconazol (derivado del Fluconazol).

Estos compuestos actúan uniéndose a enzimas clave de la ruta del mevalonato que intervienen en la ruta de síntesis del ergosterol, por lo que la membrana de las levaduras pierde fluidez y permeabilidad. También activan vías alternativas de esteroides que resultan tóxicos y producen cambios en la disposición de proteínas transmembrana. El efecto en conjunto es la inhibición del crecimiento de los cultivos, los que termina por producir la muerte celular (42,43).

1.2.4 Otros antifúngicos

Debido a la paulatina pérdida de eficacia de los antifúngicos más tradicionales anteriormente comentada, la comunidad científica ha encontrado otros compuestos que son eficaces contra las micosis en general y las candidiasis en particular. En este heterogéneo grupo encontramos, entre otras moléculas: Griseofulvina, Terbinafina, Sordarinas, Ciclopirox o la 5-Fluorocitosina, que se transforma en 5-fluorouracilo dentro de la célula e impide la replicación del ADN (46,53). Sus mecanismos de acción y especificidad son variados, ya que, por ejemplo, el último es un antimetabolito citotóxico para todo tipo de células, no solo para el reino fúngico.

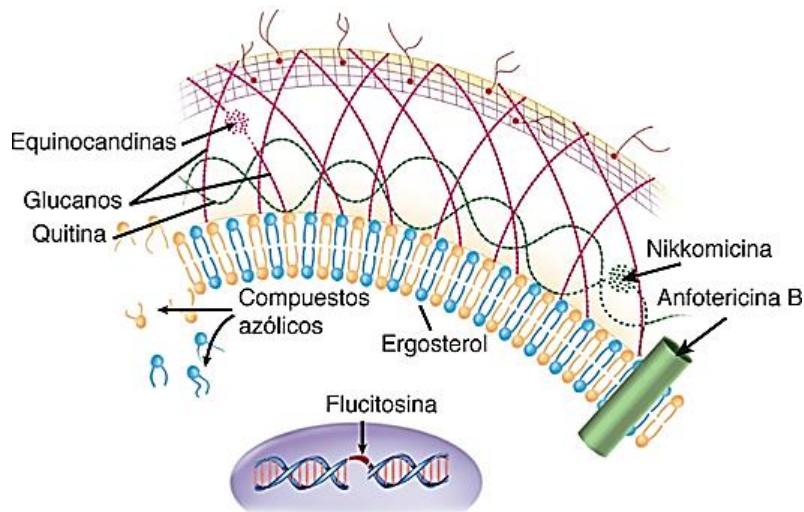


Figura 1.8. Estructura básica de la membrana y pared de los hongos con indicación de las dianas de los principales antifúngicos de uso clínico.

Fuente: (54)

1.3 PRINCIPIOS ACTIVOS DE ORIGEN NATURAL: ÁCIDO CARNÓSIDO

1.3.1 Generalidades

Las labiadas (género *Lamiaceae*) son una peculiar y amplia familia de plantas y arbustos angiospermos dicotiledóneos caracterizados por tener un tallo cuadrado, hojas opuestas y decusadas, flores hermafroditas, frecuentemente zigomorfas, de vistosa coloración, cáliz persistente y corola con los pétalos soldados (gamopétala), cuyo extremo finaliza en dos partes o labios (bilabiadas), el superior formado por dos pétalos y el inferior por tres. En cuanto a su fruto, éste es seco y formado por cuatro núculas. Los ejemplos ampliamente conocidos son el romero (*Rosmarinus officinalis*) (55), la albahaca (*Ocimum basilicum*), el espliego (*Lavandula angustifolia*), el tomillo (*Thymus vulgaris*) y la salvia (*Salvia officinalis*) (56,57).

La bibliografía existente recoge diversos estudios en los que se emplean compuestos procedentes de romero (*Rosmarinus officinalis*) frente a candidiasis, pero empleando siempre la fracción de aceite esencial que contiene exclusivamente monoterpenos, entre los que destacan cineol, alcanfor, borneol, verbenona, etc. Sin embargo, es menos común el uso de la fracción polifenólica, entre la que destacan los ácidos carnósido, cafeico y sus derivados, como el clorogénico y el rosmarínico (58), de estructura química variable (algunos diterpenos y triterpenos), pero en general más polares y menos volátiles por la presencia del grupo ácido carboxílico, por lo que no están presentes en la anteriormente citada fracción de aceites esenciales de labiadas. La estructura química del ácido carnósido y otros componentes del romero se muestran en la Figura 1.9.

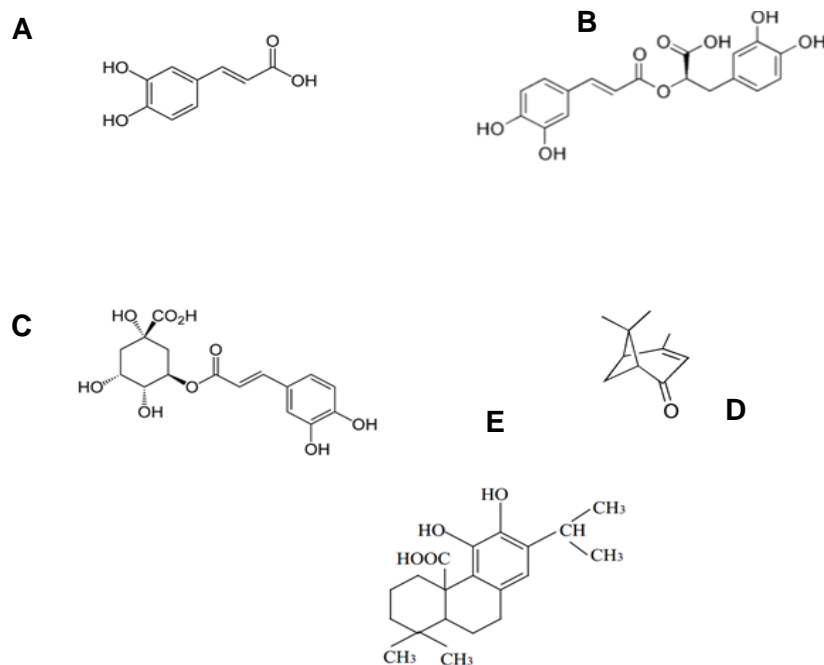


Figura 1.9. Estructuras químicas de algunos compuestos bioactivos presentes en el romero: A) Ácido cafeico. B) Ácido rosmarínico. C) Ácido clorogénico. D) Verbenona y E) Ácido carnósico.

Fuente: elaboración propia.

El ácido carnósico (CA) es un diterpeno fenólico que fue descubierto por primera vez en *Salvia officinalis* L. (59). Posteriormente, se encontraron mayores cantidades en otras plantas labiadas, especialmente en *Rosmarinus officinalis* L. donde la concentración suponía en torno al 3% en peso en las hojas (60). Desde entonces los cultivos de romero destinados a la obtención de ácido carnósico se han ido especializando no sólo mejorando sus características genéticas sino también modulando las condiciones de crecimiento, hasta alcanzar en algunos casos el 10% en peso en las hojas (61). Para ello, es fundamental regular factores como la salinidad, la luz, el estrés térmico o el uso de fertilizantes (62).

1.3.2 Propiedades biológicas estabilidad y toxicidad

El ácido carnósico posee varias propiedades y puede ser utilizado como antioxidante, antiinflamatorio, anticancerígeno y neuroprotector, a la vez que puede ser aditivo conservante de productos de diversa índole (63). Estas propiedades y aplicaciones biológicas se deben principalmente a las siguientes propiedades y/o efectos (64):

- Tiene capacidad de extinguir radicales libres por su carácter polifenólico.
- Reduce la liberación de NO, PGE2 y TNF- α .
- No bloquea la liberación de histamina.
- Suprime a nivel de transcripción la respuesta inflamatoria.

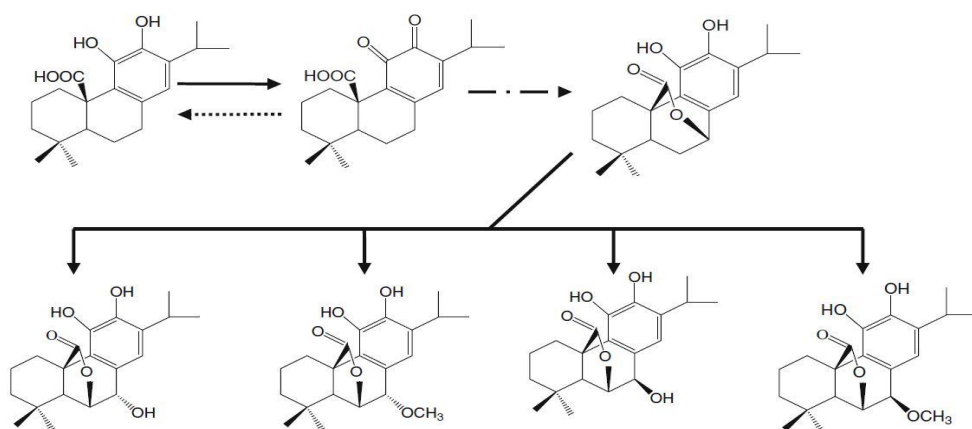


Figura 1.10. Ruta de oxidación del ácido carnósico (CA) en disolución etanólica. El primer paso es la formación de la quinona del ácido carnósico, compuesto intermedio que da lugar a carnosol (COL). La degradación del carnosol produce epirosmanol, epirosmanol etil éter y rosmanol, entre otros compuestos.

Fuente: (218)

Para los efectos antioxidantes beneficiosos del CA es importante impedir o neutralizar la degradación oxidativa del ácido carnósico. Son varios los autores que han estudiado este fenómeno y en general todos concuerdan en afirmar que utilizando como disolvente el etanol, el primer intermedio estable en la oxidación espontánea o enzimática del ácido

carnósico es la o-quinona correspondiente al ácido carnósico cuando se oxidan los grupos hidroxilos del o-difenol. A continuación, se produce espontáneamente la hidroxilación de la posición 7 del carnosol (COL), intermedio muy interesante ya que se ha descrito que posee propiedades similares a las del CA. No obstante, el carnosol a su vez puede continuar el proceso de degradación convirtiéndose en diferentes subproductos como el rosmanol, epirosmanol, epirosmanol etil éter, etc. (65). La influencia de factores como la temperatura o la luz es importante, así como la naturaleza del disolvente en el que se encuentre diluido el CA. Normalmente se utiliza etanol.

Por otra parte, los estudios de toxicidad han demostrado que este aditivo posee un perfil bajo de toxicidad tras un mes de duración con administración oral de CA. No obstante, entre sus efectos a dosis elevadas se ha descrito un descenso en los niveles de proteínas séricas totales y al contrario un aumento de los niveles de la aminotransferasa aspártica (AST o GOT). Los cambios histopatológicos en órganos como el corazón, el hígado y los riñones fueron muy leve. La dosis letal oral (LD₅₀) para ratones fue de 7100 mg/kg de masa corporal. Además, la FDA otorgó la categoría GRAS a los extractos de romero (66,67).

1.3.3 Propiedades antioxidantes y aplicaciones biotecnológicas

En la actualidad, el uso de extractos de romero ricos en diterpenos se centra casi exclusivamente en su aplicación como agentes antioxidantes (68–71) capaces de prevenir la oxidación de metabolitos y la peroxidación de lípidos, así como el consiguiente “enranciamiento” de dichos lípidos y de algunas proteínas. Esta capacidad del CA y en general de los polifenoles es debida principalmente a sus propiedades redox que desempeñan un papel fundamental en la extinción y neutralización de radicales libres y en el secuestro de oxígeno singlete y triplete. En este sentido, se ha demostrado la existencia de una relación lineal entre la capacidad antioxidante medida en valores ORAC (Capacidad de extinción de Radicales Libres) y el contenido fenólico total en varias plantas medicinales además del romero (71,72).

3.3.1 Suplemento y/o aditivo alimentario

Como se ha comentado anteriormente, la actividad antioxidante de los compuestos fenólicos del extracto de romero y más concretamente del ácido carnósico ha llevado al estudio de la aplicabilidad de éste último como conservante alimentario para sustituir los antioxidantes sintéticos como el hidroxianisol butilado (BHA) y el hidroxitolueno butilado (BHT) cuyo uso ha sido restringido en varios países porque pueden implicar riesgos para la salud (72). Se ha llevado a cabo un estudio *in vitro* sobre las actividades antioxidantes y los efectos protectores y estabilizantes del CA sobre el aceite de girasol, comprobándose su elevado potencial retrasando la oxidación lipídica de los ácidos grasos insaturados. Además, el efecto protector es dependiente de la concentración de CA añadida, de tal manera que el extracto de alta pureza de este ácido demostró incluso mayor efectividad que el BHA y el BHT (73).

➤ **Agente antimicrobiano, antiviral y antitumoral**

El potencial antimicrobiano el extracto de romero ha sido objeto de numerosos estudios, de los cuales se desprende que su eficacia en este ámbito varía de forma significativa en función de la composición y del disolvente utilizado. Concretamente, destaca el extracto que contiene 30% de ácido carnósico, 16% de carnosol y 5% de ácido rosmarínico, disuelto en metanol, aunque se señala directamente al ácido carnósico como uno de los compuestos bioactivos con mayor potencial antimicrobiano (58). Tanto un extracto relativamente crudo de romero como sus componentes principales, ácido carnósico y carnosol purificados poseen propiedades antibacterianas contrastadas frente a numerosos microorganismos patógenos como *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis* (74–76), siendo en general mucho más efectivos frente a bacterias Gram positivas que Gram negativas (77,78). En cambio, otros compuestos mayoritarios del extracto de romero como el ácido rosmarínico no mostraron actividad antimicrobiana cuando se probaron de forma aislada, sugiriendo que la presencia de grupos fenólicos podría no ser la única característica química necesaria para ejercer esta capacidad antibacteriana. En cualquier caso, no hay unanimidad en las conclusiones obtenidas en los estudios de ésta índole en relación a la eficiencia de CA y COL como antibacterianos, ya que extractos con contenidos similares de ácido rosmarínico pero diferente proporción de CA y COL contribuyen en la misma proporción a la actividad antioxidante *in vitro*, pero no en relación a la eficacia antibacteriana ya que una mayor presencia de COL aumenta esta actividad biológica (78). También se

han estudiado las propiedades inhibitorias del extracto de romero frente al virus del VIH apreciándose cierto poder citotóxico de los linfocitos afectados (79).

Por otro lado, las propiedades anticancerígenas del extracto de romero han sido objeto de estudio en células humanas de cáncer de colón mostrando potencial citostático e incluso citotóxico, llegando a identificar como compuestos más activos el ácido carnósico y el carnosol (80,81). Más específicamente, el carnosol ha demostrado ser un eficaz agente quimioterapéutico frente a líneas celulares de leucemia linfoblástica aguda induciendo la apoptosis celular (82). Estudios *in vivo* sugieren que muestra un posible papel como agente quimioprotector frente a carcinogénesis oral a través de la protección antioxidante que ejerce frente a la peroxidación lipídica (83).

Por último, también se ha investigado la implicación de CA y COL en la respuesta antiinflamatoria, encontrando que ambos están implicados en el potencial antiinflamatorio a nivel de regulación génica (84,85).

➤ **Agente fotoprotector**

La radiación solar UV provoca daños como eritema, inmunosupresión, edema, quemaduras, hiperplasia, hiperpigmentación, envejecimiento prematuro y cáncer de piel. En este sentido, es conocido que algunos fitoquímicos poseen efectos protectores frente al daño inducido por radiación UV, entre los que se encuentra el ácido rosmarínico (86). En estudios recientes se ha demostrado no sólo la atenuación del daño celular por radiación UV del ácido rosmarínico, sino también de otros compuestos polifenólicos del extracto de romero, como el ácido carnósico y el carnosol y la de flavonoides extraídos de cítricos como la naringenina. Además la combinación del extracto de romero con bioflavonoides procedentes de la uva es capaz de alcanzar una protección elevada frente a dicha radiación (87). Por último, destacar que el CA, el ácido rosmarínico y el COL poseen ciertos efectos radioprotectores frente al daño oxidativo en células humanas (88) incluso tras su exposición a radiación ionizante (89).

1.4 PRINCIPIOS ACTIVOS DE ORIGEN NATURAL: PROPÓLEOS

1.4.1 Generalidades

Este producto natural de aspecto resinoso es bien conocido mundialmente y consiste en una mezcla heterogénea de compuestos producidos por las abejas como resultado de la adición de secreciones mandibulares del insecto a las resinas recolectadas de diferentes plantas (90). Tiene una naturaleza donde predominan los compuestos lipofílicos, un color que abarca desde el amarillo verdoso y el rojizo, hasta el marrón oscuro en función de su antigüedad y su procedencia. Su aspecto es de un material duro pero quebradizo que al calentarse se torna maleable y pegajoso (91).

El término propóleo deriva de “propolis” que a su vez proviene de dos palabras griegas “pro” (que significa para la defensa o en defensa de) y “polis” (que se traduce como ciudad). De hecho, en la colmena, es utilizado para reducir las entradas, sellar grietas y embalsamar organismos muertos, protegiendo a las abejas de la entrada de microbios y organismos productores de esporas, incluyendo hongos y mohos (92). Por todo ello, es considerado como una herramienta esencial de las abejas para protegerse ante potenciales invasores de la colonia como virus, bacterias y otros organismos patógenos (93).

Inspirándose en estas aplicaciones en la propia colmena, desde tiempos remotos existen alusiones al propóleo, pues ya los griegos, los romanos y los egipcios utilizaban el propóleo para tratar todo tipo de lesiones cutáneas, como ingrediente en las momificaciones y como agente conservante. A través de los siglos otras civilizaciones como la india, la árabe y la asiática siguieron utilizando el propóleo como agente protector y medicinal. En el siglo XVII fue incorporado a algunas farmacopeas inglesas y el interés por su uso creció (94), siendo curioso su empleo en aplicaciones muy variadas, desde formar parte del barniz de los famosos violines Stradivarius, a utilizarse por los soviéticos para el tratamiento de la tuberculosis durante la II Guerra Mundial. Con todo ello, el propóleo sigue encuadrándose actualmente dentro de la medicina tradicional, aunque durante las últimas décadas ha ido ganando interés científico hasta situarse como una posible fuente natural de nuevos productos farmacéuticos para mejorar la salud y prevenir enfermedades (91). Actualmente se emplea como principio activo en diversas aplicaciones: colutorios, pastas dentales, jarabes, píldoras, cápsulas, pastillas, polvos, ungüentos, lociones y complejos vitamínicos (95). También son habituales los preparados comerciales de propóleo mezclado con otros productos naturales como aloe, rosa canina o silvestre y polen (96).

Las principales limitaciones a su uso residen en la variabilidad de su composición según la zona de recolección, su complicada y tediosa caracterización, su insolubilidad en medio acuoso y la imposibilidad de ser usado directamente, ya que el propóleo tal y como se obtiene en la recolección, debe ser tratado y purificado mediante extracción con los disolventes adecuados con objeto de eliminar el material inerte no deseado y al mismo tiempo preservar sus compuestos más activos (97).

➤ **Recolección**

Generalmente, la recolección se realiza mediante el raspado de las estructuras colocadas dentro de las celdas de las colmenas para que las abejas depositen el propóleo. Dado que estos animales lo utilizan para sellar las grietas u orificios que se producen en sus colmenas, los apicultores aprovechan este comportamiento para colocar en el techo de la colmena mallas o redes con un entramado de poro entre 2 a 4 mm y así posteriormente retirar el propóleo fácilmente enrollando la malla y dejando que caiga por gravedad. La luz y una buena circulación de aire estimulan la producción de propóleo por parte de las abejas, por lo que la parte superior de la colmena suele estar ligeramente abierto para favorecer ambas condiciones (95).

➤ **Almacenamiento**

El propóleo contiene numerosos compuestos aromáticos y heterociclos, así como flavonas y antraquinonas que son fotosensibles, por lo que una vez obtenido de la colmena, lo más normal y aconsejable es almacenarlo en la oscuridad dentro de contenedores refrigerados. En esas condiciones y tras 12 meses de adecuado almacenamiento apenas pierde actividad antibacteriana; de hecho, se tiene constancia de una muestra de propóleo brasileño cuya composición no se vio alterada tras 15 años de congelación (95).

➤ **Disolventes**

El procedimiento habitual para poder usar el propóleo es utilizar un disolvente de extracción del material crudo, que además tenga la capacidad de preservar los principios activos y eliminar el material inerte. Por ello, el disolvente es también una forma de enriquecer la disolución final de propóleo en determinados componentes o incluso

separarlos de sales y otros compuestos inorgánicos presentes en el material inicial. Los disolventes son cuidadosamente seleccionados ya que en buena medida la composición del propóleo final dependerá de la naturaleza de éste. Entre los más utilizados se encuentran alcoholes como etanol y metanol, siendo muy frecuente el uso de mezclas hidroalcohólicas, como la mezcla agua:etanol (70:30%) (98,99).

1.4.2 Composición

La composición del propóleo es muy diversa ya que depende de numerosos factores ambientales, como el lugar de recolección y la flora existente según las condiciones estacionales, temporada de lluvias o sequía y la especie concreta de abeja que lo produce. En este sentido, son varias las especies apícolas productoras de dicha sustancia, destacando la abeja denominada *Apis mellifera*, de la familia de *Meliponini*, conocidas como abejas no picadoras y productoras además de miel y polen (90,100).

La composición típica básica que suele presentar el propóleo natural no adulterado puede desglosarse en los siguientes componentes (100–104):

- 50% (w/v) de resinas. Fracción a su vez muy diversa compuesta por flavonoides y polifenoles, llamada la fracción fenólica, generalmente de características ácidas debido a los grupos carboxilo y fenólicos presentes en muchos de los componentes.
- 10% (w/v) de aceites esenciales. Suelen ser volátiles y de naturaleza monoterpénica o sesquiterpénica.
- 30% (w/v) de ceras de las propias abejas. Consisten en mezclas heterogéneas hidrofóbicas de ésteres de diversos alcoholes y ácidos grasos, así como diterpenos, triterpenos y otros terpenoides, con distinta textura y dureza según el tamaño de las cadenas lineales o ciclos hidrocarbonados presentes. Muchos de sus componentes son difíciles de separar de los dos grupos anteriores. Son adhesivos y responsables del aspecto compacto.
- 5% (w/v) de polen que se define como un polvo fino granular producido por las plantas con semilla (espermatófitos), que contienen un gametófito masculino (microgametófito) y recogido por las abejas durante la libación de las plantas cercanas a la colmena.

- 5% restante de otros compuestos inorgánicos y orgánicos, sales minerales y compuestos de naturaleza muy variada, incluyendo desde biomoléculas sencillas como azúcares o aminoácidos hasta alquitranes poco útiles.

Pero, en cualquier caso, como se ha comentado anteriormente, el propóleo tiene una composición altamente heterogénea que además puede variar en función de numerosas condiciones, dificultando que pueda llevarse a cabo su estandarización. Dichos problemas han dificultado las investigaciones y limitado su aplicabilidad real, dado que dos propóleos pueden denominarse como tal, pero poseer distintas composiciones, propiedades no del todo idénticas y por tanto eficacias distintas en tratamientos y aplicaciones medicinales. Desde el punto de vista químico, los propóleos contienen polifenoles, flavonoides, terpenos, terpenoides, β -esteroides, ácidos alifáticos y aromáticos como los ácidos ferúlicos, cinámicos y sus ésteres, gliconas, aldehídos y alcoholes aromáticos, ácidos grasos libres y esterificados, estilbenos, aminoácidos, glucosa, ácidos ferúlicos y cinámicos y otras sustancias variadas como vitaminas A, B y E, además de sales minerales (99,100,112,104–111).

Por último, y en situaciones particulares donde algunas de las especies vegetales escasean o están ausentes de la flora circundante, las abejas han llegado a sustituir las fuentes naturales por materiales sintéticos elaborados por el hombre, como asfalto y aceites minerales, pudiendo introducir sustancias insalubres con cantidades nocivas de metales como plomo, cobre, cadmio y zinc que dan lugar a una cierta toxicidad del propóleo. Esta circunstancia ahonda aún más en la necesidad de implementar y estandarizar procedimientos de análisis, control y producción más segura de este producto (96,113).

➤ **Flavonoides y otros polifenoles**

Dentro de la extensa variedad de compuestos del propóleo destaca un importante grupo constituyente del 50% de la resina, que incluye principios activos como los polifenoles, y más específicamente los flavonoides. Los flavonoides tienen unos efectos beneficiosos para la salud muy amplios y notorios. Este importante grupo de sustancias naturales que están presentes en muchos vegetales, hojas, semillas o frutos, no puede ser producido por el organismo humano, por lo que deben obtenerse mediante la alimentación o en forma de suplementos nutricionales. Debido a sus propiedades antioxidantes, protegen al organismo del daño producido por el estrés oxidativo y ROS, reducen el daño hepático provocado por

la peroxidación de ácidos grasos, inhiben el deterioro de lipoproteínas de baja densidad y los factores de la coagulación sanguínea, disminuyen la oxidación del ácido araquidónico, reducen el daño en el hígado provocado por la peroxidación de ácidos grasos y han demostrado poseer propiedades quimioprotectoras frente al cáncer además de antibacterianas, antivirales y antifúngicas (114–116).

En sentido estricto, los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenilpirano (C6-C3-C6, Figura 1.11) en tres anillos que se denominan A, C y B respectivamente, aunque existen estructuras semejantes que también se consideran dentro de la familia de los flavonoides en el sentido más amplio del término. A su vez, su estructura química puede contener un número variable de grupos hidroxilo sobre anillos aromáticos (grupos fenólicos), dando lugar a una gran diversidad de moléculas con distinta potencia en su acción biológica y con cierta especificidad.

Dentro de los flavonoides se pueden distinguir las siguientes familias: flavanoles, flavonoles, flavonas, flavanonas, antocianinas, chalconas, auronas y taninos condensados. Por otra parte, el esqueleto puede sufrir modificaciones, convirtiéndose entonces en isoflavonoides o neoflavonoides, que también se pueden considerar derivados de los flavonoides (Figura 1.11).

En función de su patrón estructural, los principales tipos se caracterizan por (117):

- Flavanoles como las catequinas, que presentan un grupo -OH en posición 3 del anillo C.
- Flavonoles, como la quercetina, que poseen un grupo carbonilo en posición 4 y un grupo -OH en posición 3 del anillo C.
- Flavonas, como la crisina, que contienen un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y un doble enlace entre los C2-C3 del anillo C y carecen del grupo hidroxilo en posición C3.
- Flavanonas, como la pinocembrina, semejantes a las flavonas, pero sin el doble enlace en el anillo C.
- Antocianidinas como la apigenidina que tienen unido el -OH en posición 3 pero también un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C. Las antocianinas, más abundantes en frutos como el arándano y excelentes antioxidantes, son glucósidos

de las antocianidinas, es decir, están constituidas por una molécula de éstas unida a un azúcar por medio de un enlace glicosídico.

- Chalconas, que son cetonas aromáticas con una enona que forma el núcleo central y son precursoras de flavonoides por ciclación.
- Isoflavonoides, como la genisteína, en los que el anillo bencénico B migra de la posición 2 a la posición 3 del anillo C, por lo que el esqueleto cambia a uno de 3-fenilcromen-4-ona. Son abundantes en la soja y tienen efectos estrogénicos que no muestran los flavonoides.

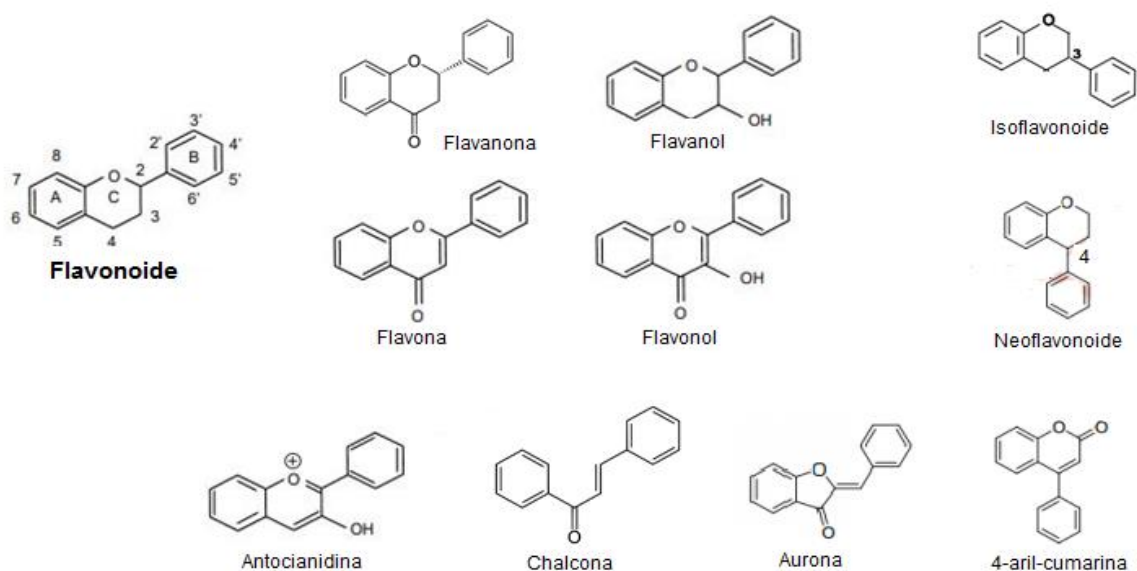


Figura 1.11. Estructura química del anillo flavonoide (arriba izquierda) y de los tipos de flavonoides más representativos.

Fuente: adaptado de (114).

En las fuentes naturales, incluidas los propóleos, los flavonoides se suelen unir a azúcares para producir glicósidos o agliconas. Tras la hidrólisis del enlace glicosídico, la parte exenta de azúcar de la molécula, es decir el flavonoide propiamente dicho, se llama aglicona. Los glicósidos son más solubles en agua y menos reactivos frente a radicales libres que sus agliconas o flavonoides respectivos (118).

Además de los flavonoides, que pertenecen al grupo más amplio de los polifenoles, los propóleos contienen otros tipos de polifenoles. Algunos de ellos contienen un grupo carboxilo, por lo que muestran propiedades más ácidas que las que confiere los grupos fenólicos, y otros son ésteres de estos ácidos fenólicos, por lo que tienen características más hidrófobas y neutras. Puede observarse que algunos de ellos, como el ácido cafeico, son comunes a los propóleos y a otros extractos vegetales, y ya se mencionó en el caso del extracto del romero utilizado como fuente de ácido carnósico. En cualquier caso, el número de variaciones y derivados del ácido cafeico es mucho mayor en propóleos que en extractos vegetales, debido a la gran cantidad de especies que pueden libar las abejas, y al propio metabolismo que tiene lugar por el insecto durante la producción del propóleo.

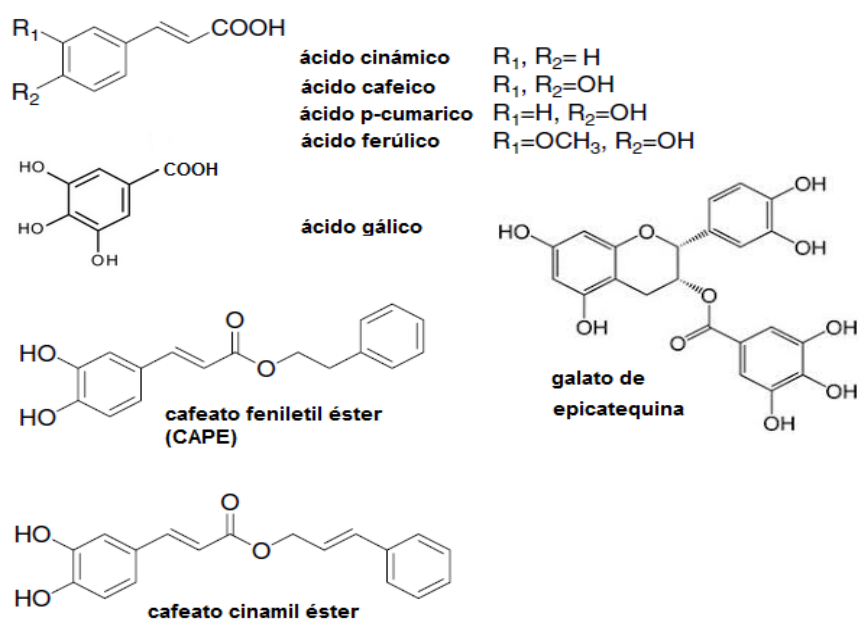


Figura 1.12. Estructura química de los ácidos fenólicos más representativos encontrados en los propóleos y algunos de sus ésteres, entre los que destaca el CAPE, que también son polifenoles. Existen ésteres de polifenoles con flavonoides, como por ejemplo el galato de epicatequina.

Fuente: adaptado de (100,115).

Estos compuestos muestran propiedades ácido-base debido al grupo carboxilo o a los grupos fenólicos, así como propiedades redox. Los radicales generados a partir de

flavonoides y polifenoles cuando éstos reaccionan con ROS pueden conservar la carga negativa a pH próximo a 7 o en un medio ácido, lo que tiene importantes repercusiones para su potencial antioxidante (115).

Como ya se ha comentado en otros apartados, el gran interés que suscitan estos principios activos del propóleo radica en gran medida en su acción antioxidante, pero también por su posibilidad de unirse a proteínas y macromoléculas biológicas como enzimas, permeasas y ADN, estabilizando estructuras con electrones desapareados; también son capaces de quelatar iones metálicos transitorios como el Fe^{+2} y el Cu^{+2} , minimizando la producción de radicales libres por la reacción de Fenton. Por ello, se han descrito como agentes protectores con aplicación para enfermedades muy variadas, entre las que se encuentran diabetes mellitus, cáncer, cardiopatías, infecciones víricas, úlcera estomacal y duodenal y procesos inflamatorios. Además, sus propiedades antimicrobianas también han sido suficientemente contrastadas (ver aplicaciones más adelante).

➤ **Compuestos volátiles y otras fracciones**

Los compuestos volátiles se encuentran en concentraciones limitadas en el propóleo (aproximadamente sólo el 10%), pero su aroma y actividad biológica les confiere cierta relevancia en la caracterización de este producto. En este sentido los mono- (C10) y sesquiterpenoides (C15) constituyen el grupo más importante encontrado en las muestras de propóleo de diversas áreas europeas, mientras que las acetofenonas preniladas, son más frecuentes en propóleos de zonas de Brasil (93). La composición química de la fracción volátil de propóleo depende, al igual que el resto de las fracciones, de la flora, las condiciones ambientales y la especie de abeja. Por ejemplo, en México, las especies *Apis mellifera* y *Melipona beechei* producen propóleos con diferentes composiciones volátiles, así como en Turquía donde los fenoles y los terpenos presentes en las muestras dependen de la especie del insecto (119).

Siguiendo la clasificación de tipos de propóleos, se puede comentar brevemente los compuestos mayoritarios de las fracciones volátiles en las regiones más destacadas:

- En Europa predominan los compuestos α -pineno, ácido benzoico, bencil benzoatos y bencil alcoholes (120), mientras que en las Islas Canarias los constituyentes principales

son sesquiterpenos hidrocarbonados o con alguna función alcohol como el espatulenol (121).

- Del propóleo turco destacan componentes como cedrol, β -eudesmol, α -eudesmol, bisabolol, β -cariofileno, δ -cadineno, β -selineno y α -cadinol (122).
- En cuanto al propóleo chino, se analizaron numerosas muestras de distinta procedencia, concluyendo que contenían casi un centenar de compuestos volátiles, de los cuales casi la mitad eran compuestos aromáticos (123).
- El propóleo verde recogido en el suroeste de Brasil contiene, entre otros compuestos: nerolidol, 1-fenil-etanona, linalool, trans-cariofileno, espatulenol y globulol (124,125).
- Respecto al propóleo rojo, frecuente en América Latina, abunda trans-anetol, metil eugenol, trans-metil isoeugenol y elemicina.

➤ **Azúcares**

Se han encontrado un número significativo de diferentes azúcares tanto mono- como disacáridos, libres o formando glicósidos con flavonoides (100), especialmente en el propóleo procedente de las Islas Canarias y cuyo origen puede deberse a la presencia de mucílago aunque este punto no ha sido del todo dilucidado (121). Los más abundantes son la glucosa, fructosa y sacarosa (93).

➤ **Hidrocarburos**

Se han encontrado propóleos en zonas geográficas muy diversas conteniendo hidrocarburos y monoésteres con propiedades muy similares a los hidrocarburos puros. En general, dentro de este grupo se han identificado alcanos, alquenos y aldienos (100). Dado que forman parte de la fracción de ceras del propóleo se estudiaron también las similitudes con éstas, sugiriendo que dichas fracciones dependen más del tipo de abeja implicada en su producción que de la flora (93).

➤ Elementos minerales

Diferentes análisis han revelado la presencia de Ca, Mg, K, Na, Fe y Zn en muestras de propóleos europeos (93,113) y Fe, Mn, Zn y Cu en muestras de propóleo cubanas (126). También se han detectado algunas trazas de elementos tóxicos como As, Cd, Hg y Pb (113,127), procedentes de la utilización de alquitranes y otros productos no naturales. Estas trazas de elementos minerales podrían ser útiles para establecer perfiles característicos de cada extracto que permitan su identificación según su origen geográfico (100).

1.4.3 Tipos de propóleos

Algunos autores han desarrollado una clasificación de los propóleos en función de su origen que permite agruparlos en varios tipos de acuerdo con una composición promedio y una localización determinada. Es destacable que a pesar de la variabilidad descrita, los compuestos presentes en la resina de propóleo tienen básicamente tres orígenes diferentes (104):

- Sustancias activamente secretadas por las plantas o bien exudadas de heridas y recolectadas por las abejas.
- Sustancias secretadas por el metabolismo de las abejas.
- Materia introducida durante la propia elaboración del propóleo.

Con estas consideraciones, en la bibliografía disponible los propóleos se clasifican en seis tipos básicos distintos (95,96):

1. Propóleo “álamo”, encontrado en amplias zonas geográficas distantes, como Europa, Norte de América, Nueva Zelanda y regiones no tropicales de Asia, cuya fuente vegetal es *Populus* spp. de la sección *Aigeiros*, siendo la más frecuente la especie *P. nigra* L. Las sustancias biológicamente activas más relevantes de este primer tipo son flavonas, flavanonas, ácidos fenólicos y cinámicos y ésteres con sus correspondientes derivados.
2. Propóleo “abedul”, característico de Rusia, cuya principal fuente vegetal es la especie *Betula verrucosa* Ehrh. Los compuestos predominantes en este caso son flavonas y flavonoles, siendo más pobre en flavanonas.

3. Propóleo “verde”, característico de Brasil, cuya fuente vegetal es la especie *Baccharis* spp., predominantemente la chilca, especie *B. dracunculifolia*. Las sustancias más abundantes son: ácidos p-cumáricos y sus derivados cumarinas, ácidos diterpénicos, compuestos prenilados y benzofenonas polipreniladas.
4. Propóleo “rojo”, encontrado en Cuba, México y Venezuela, cuya fuente vegetal es la *Dalbergia* spp. Son propóleos ricos en compuestos activos de tipo isoflavonoide.
5. Propóleo “pacífico”, originario de las islas de este océano, como Okinawa y Taiwán, cuya principal fuente vegetal es *Macaranga tanarius*. Predominan las flavanonas preniladas.
6. Propóleo “canario”. Poco estudiado, contiene lignanos (121).

Otros detalles y características de los seis grupos se detallan a continuación (95,96,104):

Tabla 1.3. Resumen de las características de los diferentes tipos de propóleo más comunes.

| Tipo de propóleo | Origen geográfico | Fuente vegetal | Principales compuestos bioactivos |
|---------------------|--|---|--|
| Propóleo Álamo | Europa, Norte América y regiones de Asia no tropicales | <i>Populus</i> sp., mayoritariamente <i>P. nigra</i> L. | Flavonas, flavanonas, ácidos fenólicos y sus derivados |
| Propóleo Abedul | Rusia | <i>Betula verrucosa</i> Ehrh. | Flavonas y flavonoles (diferentes de los anteriores) |
| Propóleo Verde | Brasil | <i>Baccharis</i> spp., mayoritariamente <i>B. dracunculifolia</i> DC. | Ácidos p-cumáricos prenilados y ácidos diterpénicos |
| Propóleo Rojo | Cuba y Venezuela | <i>Clusia</i> spp. | Benzofenonas poliprenilados |
| Propóleo "Pacífico" | Okinawa y Taiwán | Desconocido | C-prenilflavanonas |
| Propóleo "Canario" | Islas Canarias (España) | Desconocido | Furfural lignanos |

Fuente: adaptado de (95–97)

1.4.4 Propiedades biológicas

Los principales compuestos responsables de las propiedades biológicas del propóleo son, en general, los flavonoides, terpenos, ácidos aromáticos y compuestos fenólicos. En función de los diferentes tipos de propóleo ya comentados en el apartado anterior, “a priori” se podría esperar que estas distintas composiciones dieran lugar a diferentes propiedades biológicas, pero sin embargo no es del todo así. La distinta procedencia del extracto suele estar asociada a perfiles bioquímicos distintos, pero la literatura indica que muestras de muy diversa procedencia poseen actividades biológicas muy parecidas (107). A pesar de las diferencias fitoquímicas de propóleos recogidos de diversas zonas geográficas, todos parecen poseer poder antibacteriano y antifúngico en mayor o menor medida (110,112). Este aspecto tan llamativo puede ser justificado por la necesidad de todas las abejas de garantizarse un espacio vital libre de patógenos independientemente de su ubicación geográfica, aunque también se ha propuesto una cierta especificidad residual del propóleo que está relacionada con los riesgos de infecciones microbiológicas autóctonas de cada región (110).

El extracto etanólico de propóleo (EEP), ya que el etanol es el disolvente más común, ha demostrado poseer potencial antifúngico, antibacteriano y protector frente al estrés oxidativo y frente al crecimiento tumoral (128).

➤ Propiedades antioxidantes

Los trabajos científicos publicados sobre los efectos antioxidantes del propóleo son numerosos. Aunque la relación entre la composición química y la actividad antioxidante no es clara, todos los indicios apuntan a los polifenoles (flavonoides) como principales responsables. No obstante, en la identificación concreta de todas las moléculas existen ciertas discrepancias.

A nivel experimental, se han estudiado los efectos del propóleo *in vitro* mediante la exposición de cultivos de células neuronales a peróxido de hidrógeno seguido de propóleo, e *in vivo* mediante la acción de dicho propóleo en el cerebro de ratones sometidos a peroxidación lipídica y producción de radicales libres por tratamiento con DPPH. Las conclusiones indican que el propóleo podría ser beneficioso para el tratamiento de enfermedades relacionadas con el estrés oxidativo como el daño retinal (129), o en la neurodegeneración asociada al envejecimiento (130).

➤ **Propiedades inmunomoduladoras**

El propóleo estimula la actividad bactericida de macrófagos (131) y su administración intraperitoneal es más efectiva que su ingesta en la dieta (132). En dosis orales de 5 mg/kg inhibe la producción de citoquinas pro-inflamatorias y promueve la producción de citoquinas anti-inflamatorias en ratones (133). También es conocida la inhibición de la producción de INF- γ en cultivos de esplenocitos sin afectar la expresión y producción de IL-2, IL-4 e IL-10, lo que refuerza que el propóleo ejerza propiedades antiinflamatorias (134,135). Otros experimentos de preincubación de macrófagos con propóleo también han manifestado un claro efecto inmunomodulatorio y una potente acción de aniquilación de parásitos (91).

➤ **Efectos antidiabéticos y protección de enfermedades cardiovasculares**

Diversos estudios han concluido que el propóleo disminuye los niveles de glucosa en sangre, la excreción de albúmina urinaria y los niveles de malondialdehído en el tejido renal de los animales diabéticos (136,137). No obstante, otros autores recogen que no produce ningún efecto en el peso corporal, aunque sí disminuye los niveles de glucosa en sangre y de colesterol en plasma, mejorando la tolerancia a la glucosa y la sensibilidad a la insulina (138). Estas diferencias pueden deberse al tipo de propóleo utilizado y por supuesto, al propio diseño experimental.

En relación a la diabetes tipo II, el propóleo es capaz de inhibir la ganancia de peso y la formación de tejido adiposo visceral en un modelo de obesidad en ratas inducido por una alta ingesta de lípidos. Además, y en consonancia con los estudios anteriormente descritos, se ha comprobado que también reduce los niveles de glucosa, ácidos grasos libres y esterificados (139).

Respecto del metabolismo lipídico, la aterosclerosis provocada por niveles altos de colesterol puede provocar ataques cardíacos y accidentes cerebrovasculares, siendo fundamental su prevención. En este sentido, se realizó un estudio con conejos donde observaron que el tratamiento con propóleo disminuía los niveles de colesterol total LDL, triglicéridos y TBARS, así como el daño endotelial, a la vez que elevaba los de HDLC y GSH. También revertía el daño en los riñones provocado por la dieta alta en colesterol (91).

➤ **Propiedades anticancerígenas**

Es extensa la bibliografía relativa al potencial anticancerígeno del propóleo (140). Por citar algunos ejemplos, cabe destacar los ensayos de citotoxicidad con propóleo tailandés en cinco líneas celulares humanas, el cual mostró actividad antiproliferativa y citotóxica en todas ellas, siendo señalados como principales responsables el cardanol y el cardol. Tanto el extracto como esos compuestos indujeron citotoxicidad y la muerte de las células cancerígenas sin fragmentación del DNA (141). El cáncer de mama fue estudiado de forma específica con propóleo rojo brasileño comprobando que se reducía la viabilidad de las células malignas a través de la disfunción mitocondrial, activación de la caspasa-3 y la fragmentación del DNA, sin que la línea celular control se viera afectada (142).

El propóleo de Croacia en una dosis oral de 50 mg/kg reduce considerablemente los nódulos tumorales en los pulmones de ratones (143) y el propóleo mexicano produjo una fuerte acción antiproliferativa sobre células malignas de colon. También se probaron extractos de propóleo chino en líneas celulares de carcinoma de colon obteniendo 4-40 µg/ml de IC50 en una relación dosis dependiente (144). En otro tipo de cáncer como es el melanoma, la administración de propóleo a ratones con esta patología estimuló la producción de IL-10, indicando la activación de células antitumorales inmunitarias (145).

En cuanto al cáncer de próstata, se ha descrito que el propóleo de Brasil produce efectos inhibitorios mediante regulación de la expresión de las ciclinas D1 y B1 y de la proteína CDKN1A (producto del gen p21). El efecto se produce por una inducción de la apoptosis debida al factor de necrosis tumoral (TRAIL). Este factor es una citoquina que se eleva por el propóleo y estimula la apoptosis de células tumorales (146).

Finalmente, el flavonoide prenilado propolin G aislado de propóleo de Taiwán parece provocar apoptosis en líneas de glioma y glioblastoma cerebrales, probablemente mediante activación de rutas de daño mitocondrial dependientes de caspasa (147).

➤ **Propiedades antivirales**

Estas propiedades también han sido estudiadas con propóleos de diferentes orígenes. Por ejemplo, a 30 µg/ml es capaz de reducir el título del herpes simple HSV 1000 veces, mientras que los adenovirus y el VSV son menos susceptibles (148). Además, se estudió su efecto en cultivos celulares infectados con el virus HSV-2, obteniendo reducciones

significativas de la carga viral dependientes de la concentración de propóleo y del tiempo de tratamiento (149). Así mismo, han resultado sensibles al propóleo el reovirus aviar y el IBDV (150). Uno de los virus tristemente más famosos del mundo es el HIV-1 y los efectos observados indican que el propóleo puede tener cierto efecto antiviral aditivo junto con el inhibidor de la zidovudina (inhibidor de transcriptasa inversa), aunque no parece presentar ningún efecto notable sobre el inhibidor de la proteasa indinavir (151). El propóleo también podría perfilarse como antigripal ya que su administración oral de 10 mg/kg a ratones tres veces al día durante una semana mejoró notablemente los síntomas (152).

A nivel de composición, la mayoría de estos ensayos señalan a los flavonoides y a los ácidos fenólicos como los constituyentes responsables de la actividad antiviral del propóleo, postulando a las flavonas como los flavonoides más activos. Concretamente, se señala a la quercetina y al kaempferol, así como a combinaciones entre estos dos y otros componentes del propóleo (148). Otros estudios más recientes han investigado incluso posibles mecanismos de actuación, sugiriendo que los flavonoides del propóleo previenen la adhesión y entrada del virus a la célula hospedadora, impidiendo su replicación. Otro posible mecanismo consiste en la inhibición de la transcriptasa reversa y la estimulación del sistema inmune para resistir a la infección (153).

➤ **Propiedades antibacterianas**

En general, independientemente de su procedencia, todos los propóleos muestran actividad antibacteriana en distintos grados, siendo la clase álamo recolectada por la especie *Apis mellifera* la que presenta más intensidad (119). El interés en la utilización de este extracto natural como agente antibacteriano en hospitales ha ido aumentando en los últimos años debido a la alarmante y creciente resistencia a los antibióticos. Por una parte, la complejidad y variabilidad compositiva del propóleo sigue provocando ciertas dificultades, por otra parte, existen evidencias que indican que esta característica es beneficiosa por la posible interacción entre distintos propóleos y con otros antibacterianos de uso tradicional (95,154). No obstante, algunas investigaciones apuntan como principales responsables de la capacidad antibacteriana del propóleo a la pinostrobin, los ácidos cafeico y ferúlico, el ácido cumárico prenilado, algunos ácidos diterpénicos y los derivados de las benzofenonas (96).

Las bacterias Gram-positivas son mucho más sensibles al propóleo que las Gram-negativas (91,155), destacando el efecto diferencia sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Micrococcus luteus*, *Enterococcus* sp. y *Bacillus cereus* (Gram-positivas) y *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, y *Klebsiella pneumoniae* (91,96,99,156). La eficacia sobre algunas de estas especies presentes en la microbiota bucal sugiere un posible uso del propóleo en tratamientos endodónticos (94,101,157–159). Se ha sugerido que un posible mecanismo de actuación sobre esas especies podría basarse en la inhibición del quorum sensing (QS) entre las bacterias, lo que afecta al desarrollo de los biofilms (160).

➤ **Propiedades antifúngicas**

En general, son abundantes los estudios que utilizan el propóleo para el tratamiento de infecciones superficiales fúngicas (161) cuyos principales causantes son especies de *Candida* (*C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. lusitanae*, *C. glabrata*, etc.), de *Trichosporon* (como *T. asahii*, *T. ovoides* y *T. cutaneum*), de *Saccharomyces cerevisiae* y de *Geotrichum candidum*, obteniéndose evidencias que demuestran actividad fungistática y fungicida, incluso a bajas concentraciones. Los estudios cuantitativos indican que para ciertos hongos como *Trichosporon* sp., *C. parapsilosis* y *C. lusitanae*, los valores de MIC₅₀ se sitúan en el rango de 12,5-256 µg/ml (162), mientras otras especies como *C. albicans* y *C. tropicalis* (163,164) la MIC₅₀ es más del doble (25-512 µg/ml). Además, existen evidencias empíricas que demuestran que el propóleo puede combatir la formación de biofilms por especies de *Candida*.

En cuanto a los componentes del propóleo responsables de este efecto antifúngico, se han identificado algunos potencialmente capaces de causar daño en la membrana o pared celular, como son los flavonoides o los ácidos cafeico, benzoico y cinámico (94,102).

El potencial antifúngico del propóleo está relacionado, muy probablemente, con la presencia de ciertos flavonoides, siendo uno de los mecanismos de actuación propuestos la disrupción de la pared celular, con preferencia frente a una posible afectación del ergosterol de la membrana. Además, parece ser efectivo contra los biofilms, tanto si se encuentran en su estado más incipiente como si son totalmente maduros (109). No obstante, las revisiones y meta-análisis llevado a cabo en este aspecto, sugieren que la

eficacia del propóleo para el tratamiento de enfermedades de carácter oral, tópico o genital, adolecen de calidad, siendo muy poco estrictos con el tamaño de las muestras y con la metodología seguida (165).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, los objetivos propuestos para esta Tesis Doctoral han sido los siguientes:

- Evaluar el efecto antifúngico del propóleo y del ácido carnósico frente a diferentes bacterias, así como frente a *Candida albicans*, utilizando para ello distintos métodos como la determinación de viabilidad en medio líquido, la formación de colonias macroscópicas o el cálculo de las MICs definidas como la concentración mínima de antifúngico necesaria para inhibir la proliferación de un inóculo estandarizado.
- Estudiar dicho efecto en otras especies del género *Candida* y otros hongos como *Cryptococcus neoformans* con fines de eficacia comparativa para conocer la amplitud de su espectro de acción.
- Aislar e identificar los principales compuestos presentes en el propóleo responsables de sus propiedades antifúngicas.
- Estudiar el efecto producido por la combinación de ambos extractos naturales, así como, con algunos antifúngicos más convencionales.
- Proponer posibles mecanismos implicados en la capacidad antifúngica de ambos extractos naturales.
- Estudiar el potencial uso de estos compuestos a nivel industrial, formulando para ello un producto comercial de amplio uso como un gel dental. Llevar a cabo los ensayos *in vitro* pertinentes y realizar un ensayo de intervención biomédica en humanos con el que estudiar su eficacia *in vivo*.

MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 MATERIALES

Se utilizó un conjunto de bacterias y levaduras, conservadas en glicerol a -80°C al 50% (v/v). A partir de estos “stocks celulares” se llevaron a cabo subcultivos en medio YPD, mantenidos a 4°C hasta su uso en el laboratorio.

3.1.1 Bacterias

En la Tabla 3.1 se recogen los datos de las bacterias utilizadas.

Tabla 3.1. Bacterias empleadas en esta Tesis Doctoral.

| Bacteria | Cepa | Referencia |
|-----------------------------------|-----------|------------|
| <i>Escherichia coli</i> | ATCC4157 | (166) |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> | ATCC1798 | (167) |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | ATCC27853 | (168) |

3.1.2 Levaduras

Las características de las distintas cepas de *C. albicans*, *C. glabrata* y *C. neoformans* utilizadas en el presente trabajo, así como su procedencia, se detallan en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2. Levaduras utilizadas en esta Memoria.

| Levadura | Cepa | Referencia |
|--------------------------------|-----------|---|
| <i>Candida albicans</i> | SC5314 | (169) |
| | 015 | Aislado Hospital “La Fe” (Dr. Valentín) |
| <i>Cryptococcus neoformans</i> | H99 | (170) (Dr. Oscar Zaragoza) |
| <i>Candida glabrata</i> | ATCC 2001 | (171) |
| | YA-1 | Aislado Hospital V. Arrixaca (Dra. Yagüe) |

Las levaduras fueron mantenidas en el laboratorio a 4^o C mediante resiembras periódicas en medio YPD sólido cada 30 días, a partir del material conservado en YPD líquido a -80°C con 50% de glicerol (v/v) (Sigma, St. Louis, MO, USA). Todos los procesos de manipulación microbiológica se efectuaron en condiciones estériles en una cámara de flujo laminar Captair que incorpora gas, luz y ventilación regulable.

3.1.3 Extractos naturales

Como fuente natural de ácido carnósico (CA) se empleó un extracto obtenido y purificado a partir de plantas labiadas cultivadas, que en este caso concreto fue de romero (*Rosmarinus officinalis*). El extracto tenía un contenido total en diterpenos superior al 80%, siendo el contenido en CA del 72%, y es el utilizado de forma rutinaria en el trabajo descrito en la Memoria. Como disolvente se utilizó etanol 96% v/v (Panreac Applichem). El extracto de carnósico enriquecido (CA92) que se utilizó en la última parte de esta Memoria (ver Apartado 4.5.3) presentaba un contenido en CA mayor, del 92%. La composición de ambos preparados se recoge en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3. Composición de los extractos de ácido carnósico (CA y CA92) utilizados en la Tesis Doctoral.

| Componentes | Extracto CA (72%) | Extracto CA92 (92%) |
|--------------------------|--|--|
| Agua | 2-4% | 1-3% |
| Sales Minerales | 1-2% | 1-2% |
| Proteínas | 0-0,5% | 0-0,5% |
| Lípidos | 5-10% | 1-2% |
| Hidratos de carbono | 2-5% | 0-1% |
| Ácido carnósico | 72% | 92% |
| Diterpenos minoritarios | 3-7% (carnosol, rosmanol, epirosmanol, 12-metil carnosato) | 0,1-0,5% (carnosol, rosmanol, epirosmanol, 12-metil carnosato) |
| Otros vegetales variados | 2-4% | 0-1% |

Actualmente no existen productos comercializados con una concentración de CA mayor del 70% aproximadamente. En consecuencia, resulta imposible usar extractos de más pureza con fines prácticos y con absoluta ausencia de otros diterpenos, ya que su nula disponibilidad actual, conllevaría un precio prohibitivo (ver Apartado 4.5.3). Por otro lado, todo compuesto de origen natural obtenido por medio de procesos físicos (extracción, cristalización, etc.) en cualquier grado de pureza o concentración es un extracto. Cuando un extracto contiene una concentración muy elevada (> 50%) de un determinado activo, suele denominarse con el nombre de dicho activo acompañado del % de riqueza de éste, a pesar de que, obviamente, cualquier extracto vegetal contiene otros compuestos similares o no, en proporciones minoritarias. De hecho, aunque un compuesto tenga una pureza del 99,99%, no deja de ser un extracto.

El CA fue analizado por HPLC según el método descrito por Benavente-García et al. (172), obteniéndose el siguiente cromatograma:

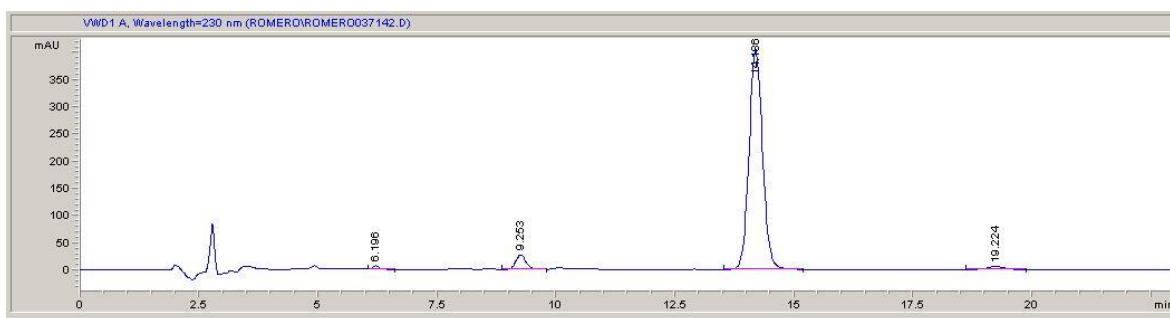


Figura 3.1. Cromatograma del ácido carnósico 72% a 230 nm

Se emplearon tres extractos de propóleo diferentes en cuanto a su concentración y distribución de polifenoles, y de otros compuestos naturales aromáticos, caracterizados mediante análisis HPLC (ver Apartado 4.3.1). Normalmente se comparan valorando los compuestos polifenólicos, aceites esenciales y algunos flavonoides como pinocembrina (un flavonoide característico presente en casi todos los propóleos), y por valoración espectrofotométrica de su poder antioxidante mediante la técnica universalmente aceptada de valoración con el reactivo de Folin-Ciocalteu (173):

- P2: propóleo 2, molido y disuelto en etanol 96% v/v (Panreac Applichem), con una concentración de comercial activos del 70-75% y de origen asiático. Proporcionado por Monteloeder (Elche Parque Empresarial, Alicante, España).
- P3: propóleo 3 molido y disuelto en etanol 96% v/v (Panreac Applichem), con una concentración de activos del 85-90% y de origen asiático. Proporcionado por Monteloeder (Elche Parque Empresarial, Alicante, España).
- P5: tintura de propóleo comercial “El abuelo Félix” que según instrucciones del suministrador contiene propóleo (15%) disuelto en una solución hidroalcohólica con 65% de alcohol de uva. La concentración de activos es desconocida.



Figura 3.2. Ácido carnósico (72%) obtenido a partir de extracto de romero.



Figura 3.3. Propóleo P3 tras molienda del bloque original.

Respecto a los extractos comerciales con contenido variable en Z (ver Apartado 4.3.11), se adquirieron tres, denominados:

- Z(1): casa comercial “Naturix24”
- Z(2): casa comercial “Casa Santa Hildegarda”
- Z(3): casa comercial “Youdoit”

3.1.4 Medios de cultivo

La composición del medio de cultivo utilizado para el crecimiento de las diferentes cepas de levaduras fue YPD (Yeast extract Peptone Dextrose) que consiste en un medio complejo que contiene todas las sales minerales y vitaminas necesarias para el crecimiento rutinario de levaduras (174). Su composición es la siguiente:

- 2% glucosa
- 2% peptona
- 1% extracto de levadura
- 2% agar (utilizado para el medio sólido)

El medio líquido se preparó en agua bidestilada y se esterilizó en autoclave a 120 °C durante 20 min. El medio sólido fue suplementado con agar al 2%. En los ensayos de cultivo líquido, el medio se dispensó en matraces Erlenmeyer de vidrio, con una relación entre el volumen del medio y su capacidad total de 1/3 para facilitar su aireación. Los inóculos se crecieron a 30°C durante toda la noche y salvo cuando se indica lo contrario, los cultivos se refrescaron de forma rutinaria a 37°C en nuevo medio YPD, tanto en medio sólido como en líquido. Para el crecimiento se utilizó un incubador Certomat H (Braun), dotado de agitación orbital (210 rpm). Dichos cultivos se hicieron crecer hasta alcanzar la fase exponencial equivalente a una densidad óptica (DO) medida a una longitud de onda (λ) de 600 nanómetros (DO_{600}) de entre 0,8-1,0, que corresponde a una densidad celular de 1×10^7 células/ml. En su preparación se utilizó agua destilada y el medio se esterilizó mediante calor húmedo en autoclave de vapor a 120 °C durante 20 minutos.

Para la realización de los ensayos de sensibilidad en placa o antibiogramas se utilizó como base medio YPD sólido al que se le añadió la cantidad de compuesto que se estimó necesaria para alcanzar la concentración requerida.

Los antifúngicos comerciales que se emplearon, a las concentraciones indicadas en los resultados, se enumeran a continuación:

- Anfotericina B (AmB), adquirida de AppliChem GMBH.
- Micafungina (MF), en formato farmacológico de Micamina, suministrada por Astellas Pharma Europe B.V.

- Fluconazol, adquirida de Sigma-Aldrich.
- Piperacilina, suministrada por Oxoid
- Amikacina, suministrada por Oxoid

Todos ellos se prepararon en alícuotas a partir de una disolución madre de 10 mg/ml, se disolvieron en DMSO y se almacenaron en viales de vidrio a -80°C hasta su utilización. Como el DMSO podría resultar tóxico para las células eucariotas en función de la dosis, en cada experimento realizado se dispuso de un control adicional con DMSO al 1%.

Para el crecimiento de los cultivos líquidos se utilizó el incubador Medilow-P (Selecta), con una agitación orbital de 210 rpm. La estufa incubador Heraeus de Thermo Scientific, programada a 30 o 37°C se utilizó para incubar los medios en estado sólido.

3.1.5 Geles dentales

Los geles dentales formulados conteniendo como principios activos CA y P3, tienen una composición genérica muy similar a cualquier otro producto comercial de la misma índole (Tabla 3.4):

Tabla 3.4. Composición porcentual de los geles dentales empleados en el presente trabajo.

| COMPOSICIÓN GEL DENTAL | |
|-------------------------------|----------|
| Componente | % |
| Agua | 24,00 |
| Saborizante 1 | 1,00 |
| Glicerina | 22,00 |
| Saborizante 2 | 33,40 |
| Agente abrasivo | 8,00 |
| Espesador 1 | 0,60 |
| Espesador 2 | 0,50 |
| Aroma | 1,00 |
| Detergente | 1,50 |
| Blanqueante | 1,00 |
| Estabilizador natural | 1,00 |
| Disolvente | 3,00 |
| P3 | 2,00 |
| CA | 1,00 |

Para su elaboración, se siguió el siguiente procedimiento:

- Se calentó el agua y se añadió el estabilizador y el saborizante 1 con agitación continua. Seguidamente, se adicionó la glicerina y el saborizante 2 hasta su completa disolución. Seguidamente, se añadió el espesador 1, el blanqueante y el saborizante 2 y se homogenizó la mezcla atemperada a unos 50°C mediante agitación suave.
- En un recipiente aparte, se mezcló el aroma con el espesador 2, se homogenizó y se añadió a la mezcla anterior.
- A continuación, el detergente se disolvió en agua (relación 1:6) en otro recipiente con agitación muy suave y se adicionó a la preparación anterior.
- Finalmente se añadieron los principios activos ya disueltos y se volvió a agitar suavemente hasta su homogenización total.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Antibiógramas

El día anterior se preparó un preinóculo a 37°C de las levaduras *C. albicans* y *C. parapsilosis* y de las bacterias *S. epidermidis* y *E. coli*. Al día siguiente se ajustó a una densidad óptica 0,5 MacFarland en solución salina (5 ml) que corresponde a una DO₆₀₀ de 0,1. Esta disolución tiene una concentración aproximada de 1x10⁶ UFC/ml para levaduras y 1x10⁸ UFC/ml para bacterias. A continuación, se sumergió una torunda de algodón estéril en la suspensión ajustada, se retiró el exceso de líquido rozando la torunda con las paredes del tubo y se sembró en las placas de Mueller-Hinton (MH) suplementado con glucosa al 2% y 0,5 µg/ml de azul de metileno para levaduras, realizando una siembra en tres direcciones. Se dejaron secar las placas 3-5 min y se aplicaron los discos de 6 o 13 mm de diámetro o bien se realizaron los sacabocados de 6 mm de diámetro. Finalmente se incubaron en posición no invertida a 37°C durante 24 horas. En caso de que no hubiera suficiente crecimiento a las 24 horas se re-incubaron las placas para leer a 48 horas. Por último, se midió el halo de inhibición del crecimiento celular provocado por el antimicrobiano (175).

En el caso de placas de MH suplementadas con glucosa al 2% y 0,5 µg/ml de azul de metileno, se preparó el medio rutinario de MH y se le añadió 20 g de glucosa por litro de medio. Se adicionaron 100 µl de la disolución de azul de metileno (5 mg/ml) por cada litro de medio y se esterilizaron en autoclave, dejando enfriar el medio a 45-50°C. A continuación, se llenan las placas con 30 ml de medio para que la altura de la capa de agar sea de unos 4 mm.

En los ensayos de antibiógramas con diferentes pastas de dientes, se debe añadir al procedimiento anteriormente descrito la manipulación de dichas pastas, ya que se pesó 1 g de cada pasta y se le añadió 1ml de agua destilada (1g/1ml) (1:1). Finalmente se depositaron 25 µl de cada pasta en los sacabocados de 6 mm.

3.2.2 Turbidimetría

El crecimiento de las bacterias y de las células levaduriformes (blastocnidios) en cultivo líquido se determinó mediante turbidimetría, realizando medidas de densidad óptica a longitud de onda de 600 nanómetros (DO_{600}) en un espectrofotómetro SHIMADZU UV-1203. Para ello, se realizaron previamente las diluciones adecuadas, de forma que la medida de densidad óptica estuviera en el intervalo de linealidad entre el valor medido y el número de células real del cultivo.

3.2.3 Ensayo de viabilidad

Los cultivos crecidos en medio YPD y recogidos en fase exponencial ($DO_{600} = 0,8-1,0$) se dividieron en alícuotas idénticas, que fueron sometidas a estrés con la combinación de los extractos naturales antifúngico, indicados en cada experimento particular o, en su defecto, se mantuvieron en ausencia de estos compuestos a 37° C como ensayos control de referencia.

El efecto provocado en los cultivos de las cepas estudiadas por la adición de los compuestos objeto de estudio se midió mediante un análisis comparativo entre la viabilidad registrada en ensayos control y los sometidos a tratamientos específicos. Para ello, se recogió una alícuota de 1 ml de cada cultivo en condiciones estériles, y se realizaron varias diluciones con agua destilada estéril, en función de la DO_{600} alcanzada. Se dispensaron 100 μ l de cada dilución en duplicado sobre placas Petri conteniendo medio sólido YPD. La suspensión se extendió en césped por toda la placa mediante agitación suave con perlas de vidrio (3 mm de diámetro).

Las placas se incubaron a 37° C durante 24 horas y posteriormente se efectuó un recuento del número de Unidades Formadoras de Colonias por ml (UFC/ml) de aproximadamente 30-300 colonias por placa. En cada caso, se hallaron los valores promedio para cada muestra tratada y el porcentaje de células viables o supervivientes se refirió a una muestra control, sin exposición al estrés respectivo, que representaba el 100% de viabilidad.

Otro aspecto particular del estudio de la viabilidad celular fue la evaluación de la estabilidad del efecto del ácido carnósico y propóleo a lo largo del tiempo. Como estos compuestos indican una cierta inestabilidad de estos agentes, bien por oxidación química o por su degradación en las células fúngicas, para estudiar el efecto a tiempos largos, se realizó una serie en la que se producía la re-adición de dichos compuestos a la misma concentración inicial a las 10 horas del inicio del ensayo. Por tanto, para estas series dobles de efecto a tiempo largo (24 horas), el procedimiento aunque es muy similar al descrito anteriormente, se detalla a continuación: se incubó un preinóculo de la cepa 015 a 30°C que se mantuvo durante toda la noche y al día siguiente se refrescó hasta una ajustar una $DO_{600} = 0,8-1,0$. A continuación se realizaron diferentes alícuotas del cultivo y se les aplicaron los distintos compuestos: ácido carnósico (50 $\mu\text{g/ml}$), propóleo (200 $\mu\text{g/ml}$) y una mezcla de ambos compuestos. A distintos tiempos (1, 10 y 24 horas) se recogieron muestras para el recuento de viables y formación de colonias en medio sólido. La segunda muestra de 24 horas, llamada como (S+10), corresponde a una alícuota de las células tratadas con ambos compuestos a la que a las 10 horas se le volvió a aplicar la misma dosis de ácido carnósico y propóleo.

Por último, hay que especificar que, en los ensayos de viabilidad con geles dentales, la concentración de éstos en el medio de cultivo fue de 5 mg/ml.

3.2.4 Ensayo de sensibilidad: formación de colonias macroscópicas en medio sólido

Se trata de una medida cualitativa referente al crecimiento y comportamiento de los microorganismos en medios sólidos con los distintos agentes estresantes. Se realizó mediante diluciones seriadas y posterior dispensa en gotas de los inóculos correspondientes. Para ello, el preinóculo de *Candida* se deja crecer durante la noche a 30°C. Al día siguiente, se comprueba al microscopio que no está contaminado y se refresca en un medio YPD a una densidad óptica de 0,3 ($DO_{600} = 0,3$). El cultivo se deja crecer hasta $DO_{600} = 0,8-1,0$ a 37°C, momento en el que se añadieron los compuestos de estudio durante una hora a la misma temperatura. A partir del cultivo inicial, se practicaron diluciones seriadas en el rango de 10^2 hasta 10^6 , y se depositaron gotas de 5 μl de cada dilución sobre

placas Petri conteniendo los tratamientos específicos. Un crecimiento colonial suficiente se obtuvo tras incubación a 37°C, durante un día y posteriormente las placas se fotografiaron. Adicionalmente, se incluyó un cultivo como control en las mismas condiciones anteriormente descritas y, ocasionalmente control positivo de actividad antifúngica con Anfotericina B (AmB).

3.2.5 Ensayos de filamentación en medio líquido

Para inducir la emisión de tubos germinativos en *C. albicans*, se empleó el método consistente en provocar la conversión de levadura a hifa mediante la adición de suero humano al 10% procedente de muestras clínicas (176) (Hospital General Reina Sofía Murcia) y simultáneamente aumentar la temperatura desde 30 a 37°C para estimular la filamentación. Los cultivos se incubaron en medio YPD a 30°C hasta alcanzar fase exponencial temprana ($DO_{600} = 0,3-0,5$). Las muestras (5-10 ml) se recogieron y lavaron rápidamente con agua destilada fría estéril y se re-suspendieron hasta alcanzar una densidad óptica de 0,8-1,0 en medio YPD fresco conteniendo suero humano al 10 % (v/v) previamente esterilizado por filtración (0,45 μ m, Millipore), siendo incubadas a 37° C durante una hora.

3.2.6 Microscopía óptica

Tras la exposición a los antifúngicos se estudió la morfología con un microscopio óptico Leica DMRB, utilizando la técnica de contraste de interferencia diferencial de Nomarski. Dicho microscopio estaba equipado con una cámara Leica DC500 conectada a un PC donde estaba instalado el software Leica Application Suite V 2.5.0 R1.

3.2.7 Determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) de diferentes antifúngicos

La concentración mínima inhibitoria de los potenciales antifúngicos que afectan a la actividad celular se determinó mediante el método de microdilución en placa del EUCAST (European Commitee on Antimicrobial Susceptibility Testing). Las cepas se cultivaron en placas de Saboraud-dextrosa a $35^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 horas antes de realizar el test. Al día siguiente se preparó el inóculo, que consistió en coger al menos 5 colonias (con un diámetro mínimo de 1mm) de cada cepa en suero salino obteniendo una concentración de 3×10^6 UFC/ml realizando el proceso en condiciones de esterilidad. La turbidez de esta suspensión se midió en un espectrofotómetro SHIMADZU UV-1280 y se ajustó diluyendo con agua estéril, para que contuviera aproximadamente 3×10^5 UFC/ml. Se tomó 100 μl de la suspensión de levaduras y se dispensaron en placas de 96 pocillos de fondo plano. Las disoluciones madre de los compuestos objeto de estudio se prepararon en etanol 96% v/v (Panreac Applichem), y se diluyeron en RPMI (con glutamina y sin bicarbonato) tamponado con ácido morfolino propano sulfónico (MOPS) 0,164M (ICN, Sigma), ajustado a pH $7,0\pm 0,1$, más 2% de glucosa, para que la concentración final de etanol en la microplaca fuera inferior al 1%. Se llevaron a cabo diluciones seriadas de los antifúngicos en concentraciones decrecientes y se adicionaron a cada pocillo 100 μl . Las placas se incubaron a $35^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 24 y 48 horas (*Candida* y *Cryptococcus*, respectivamente) en ambiente húmedo para prevenir la evaporación del medio. Transcurrida la incubación se procedió a la lectura espectrofotométrica de las MICs a 530 nm.

Paralelamente, se inoculó una placa sólo con las diluciones de los potenciales antifúngicos, sin levadura. La lectura obtenida se restó a las placas que contenían la levadura con el objetivo de evitar la interferencia en el resultado final que provocaría la coloración inherente de los compuestos naturales. Cada ensayo se realizó por triplicado, utilizándose los datos más representativos.

La MIC_{50} es la concentración más baja en la que se observa una disminución en la $\text{DO}\geq 50\%$, con respecto a la del control de crecimiento aplicando la fórmula: % inhibición de crecimiento = $(\text{DO}_x - \text{DO}_{\text{CE}}) \times 100 / (\text{DO}_{\text{CC}} - \text{DO}_{\text{CE}})$. Siendo DO_x el pocillo con antifúngico, DO_{CE} el pocillo de control de esterilidad y DO_{CC} el pocillo de control de crecimiento.

3.2.8 Separación de fases del propóleo en columna (SPE)

El fraccionamiento en fase sólida de propóleo se realizó empleando los cartuchos rellenos Strata-X (33 μm Polymeric Reversed Phase 60 mg/3mL 8B-S100-UB) SPE (Phenomenex) (ver Figura 3.4) mediante aplicación de la muestra a la parte superior del cartucho (o columna) y su difusión en el relleno hidrofóbico hasta alcanzar el equilibrio entre las fases líquida y sólida. Las sucesivas aplicaciones de eluyente con contenido creciente en etanol 96% v/v (Panreac Applichem), tuvieron como objetivo favorecer la desorción de los componentes más hidrofóbicos, siguiendo el protocolo descrito en la Figura 3.5 (177). El método utilizado en este trabajo se detalla a continuación.

- Inicialmente se acondiciona la columna en dos etapas: en primer lugar, se adicionan 2 ml de metanol y tras su elución, se aplican 2 ml de acetato amónico 20 mM como tampón equilibrante.
- Una vez que la columna queda acondicionada, se aplican sobre la columna 200 μl de la muestra de propóleo (crudo o fracción que corresponda) y a continuación otros 200 μl de la anterior disolución de acetato amónico.
- La siguiente etapa es la de lavado con 2 ml de acetato amónico 20 mM conteniendo 15% de metanol. Tras 10 min. de incubación a temperatura ambiente para permitir el equilibrio, el cartucho se somete a una suave centrifugación durante 15 segundos a 1.000 rpm, recogiendo el eluido.
- En las siguientes fases de fraccionamiento, se fueron aplicando a la columna sucesivamente 2 ml de disoluciones con concentraciones crecientes de etanol (denominados 0, 25, 50, 75 y 100% para simplificar y no introducir el factor de 96% en cada fracción). De forma similar a la etapa anterior, los eluidos respectivos se recogieron mediante centrifugación de la columna. Para el análisis de las subfracciones, se toma una alícuota de cada muestra para analizar por HPLC. El resto de la fracción se lleva a evaporación para obtener los sólidos (ver Apartado 3.2.8).

En cada etapa de elución, la aplicación de la disolución eluyente se realizaba de forma lenta y uniforme sobre toda la superficie superior del cartucho y se mantenía a temperatura

ambiente durante unos minutos para que se alcanzara el equilibrio en las interacciones de los distintos componentes con la fase sólida en cada una de las condiciones.

Cuando fue necesaria una segunda etapa de subfraccionamiento, con objeto de acotar de forma más precisa la fracción de mayor actividad antifúngica, las concentraciones de etanol que se emplearon fueron distintas, pero respetando el orden ascendente: 0, 25, 50, 55, 60, 65, 70, 75 y 80%.



Figura 3.4. Cartucho Strata-X, B-S100-UB, SPE (Phenomenex) empleado en el fraccionamiento del propóleo.

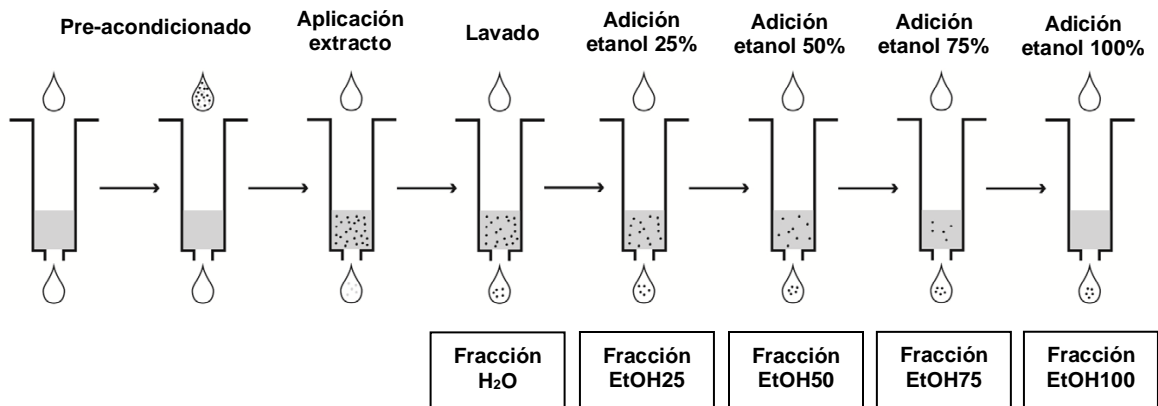


Figura 3.5. Esquema del fraccionamiento del propóleo en un cartucho SPE variando la polaridad de las fases móviles empleadas. Tras las etapas de acondicionamiento, carga del extracto y lavado, se lleva a cabo la elución de las fases mediante disoluciones de etanol de porcentaje creciente. Esta etapa es adaptable a las necesidades de fraccionamiento que se puedan dar mediante el contenido en etanol de las disoluciones que se utilicen.

Fuente: adaptado de (177)

3.2.9 Obtención de los compuestos de cada fracción de propóleo P3

Una vez separada cada fracción y tomada una pequeña alícuota para su análisis por HPLC, se debía eliminar el disolvente para determinar el peso de los compuestos sólidos y hallar así su porcentaje dentro del P3. Para ello, las fracciones se llevaron a un rotavapor a 600 mm Hg de vacío una temperatura de 60-65°C (Figura 3.6) para evaporar la mayoría del líquido, pero el etanol no se dejaba evaporar totalmente, y las fracciones se llevan a un desecador termostático de vacío con campana de vidrio (vacuo-temp), mostrado en la Figura 3.7, con las mismas condiciones de temperatura y operación iniciales, hasta alcanzar sequedad total. Los sólidos resultantes se llevan a un desecador durante 10 minutos (Figura 3.9) tras los cuales se pesan en una balanza de precisión. Dicha pesada, permitirá calcular el porcentaje que representa cada fracción respecto del total, es decir, de la cantidad de P3 originalmente utilizada para realizar el fraccionamiento.

Por último, para recoger los sólidos se añaden 0,5 ml de etanol y se re-suspenden mediante agitación suave hasta su disolución; esas preparaciones se mantienen refrigerados a 4°C en un tubo eppendorf. Debe tenerse en cuenta que antes de ensayar su actividad, estas preparaciones se deben diluir de forma adecuada en el medio para que en el ensayo de actividad antifúngica el etanol no afecte los resultados, lo que significa que el contenido residual final de etanol en el ensayo debe ser inferior al 1%.



Figura 3.6. Rotavapor utilizado para evaporar el etanol de las muestras.



Figura 3.7. Desecador termostático a vacío (vacuo-temp) utilizado para evaporar el etanol de manera controlada.



Figura 3.8. Equipo de HPLC de Agilent utilizado en el presente trabajo.



Figura 3.9. Desecador utilizado para eliminar la humedad en las muestras antes de ser pesadas.

Este procedimiento se lleva a cabo tanto para el fraccionamiento inicial con fases móviles de concentraciones crecientes del 25% en etanol, como para el subfraccionamiento con la diferencia de que al obtener la fase objeto de subfraccionamiento, el intervalo de concentraciones de etanol en la fase móvil pasa a ser del 5%.

3.2.10 Análisis HPLC

Las condiciones del análisis por HPLC fueron descritas en el artículo escrito por Benavente-García et. al (172). El CA y el propóleo (5 mg/ml) fueron disueltos en DMSO, filtrados usando una membrana de nylon de tamaño de poro de 0,45 μm y posteriormente se tomaron 20 μl de la disolución para ser inyectados en una columna de fase reversa LiChrospher 100-C18 (250x4,0 mm diámetro interno y tamaño medio de partícula de 5 μm) termostaticado a 30°C. La fase móvil (flujo de 1 ml/min) consistió en el gradiente de concentraciones que se detalla en la Tabla 3.5.

Tabla 3.5. Gradiente de la fase móvil del análisis HPLC.

| Tiempo (min) | Ácido acético 2,5% | Acetonitrilo |
|--------------|--------------------|--------------|
| 0 | 95 | 5 |
| 20 | 75 | 25 |
| 40 | 50 | 50 |
| 50 | 20 | 80 |
| 60 | 95 | 5 |

La detección de los componentes se registró con un detector Diodo-Array Agilent UV-Vis (Figura 3.8). De forma rutinaria los perfiles se registraron a 280 nm, aunque por la naturaleza del detector, el perfil de elución puede observarse en otras longitudes de onda, utilizándose 280 y 340 nm cuando fue necesario para el de seguimiento de posibles flavonoides.

Cuando fue posible, los compuestos se identificaron por comparación de su tiempo de retención con los estándares correspondientes, y su concentración se cuantificó por comparación con el área del pico de los estándares inyectados en la columna a una concentración similar y conocida. En otros casos, la cuantificación no fue posible por no conocer la identidad del componente.

3.2.11 Análisis LC/MS

Este análisis lo realizó el Servicio de Apoyo a la Investigación (SAI) de la Universidad de Murcia en el edificio SACE del Campus de Espinardo. El equipo utilizado fue HPLC Agilent serie 1200 acoplado a un espectrómetro de masas con analizador de tiempo de vuelo modelo MS TOF 6220 de Agilent.

3.2.12 Enriquecimiento del extracto comercial de Z (Z1*)

Los extractos comerciales Z(1), Z(2) y Z(3) contenían unas cantidades de Z muy bajas por lo que se decidió tatar de enriquecerlos, partiendo de Z(1) que era el que mayor concentración tenía. El producto resultante se denominó Z1* y el proceso seguido, aunque no se puede detallar con exactitud por razones de confidencialidad, se indica brevemente:

- Extracción a reflujo con etanol-agua (70:30) (10% peso/volumen) (tiempo 1-2 horas).
- Filtración.
- Evaporación-concentración hasta un jarabe muy concentrado, casi seco.
- Lavado con hexano para eliminar grasas extraídas.
- Separación las dos fases por decantación.
- Secado el jarabe a vacío y obtener un sólido.
- Lavado el sólido con agua hasta disolver todos los polisacáridos extraídos.
- Filtrado el sólido insoluble en agua.
- Secado el sólido a vacío.

3.2.13 Soporte bioinformático, representación gráfica de los resultados y tratamiento estadístico de los datos

A lo largo del extenso desarrollo experimental de esta Tesis Doctoral, se han consultado diferentes bases de datos y se han empleado herramientas bioinformáticas disponibles en internet. Las más utilizadas fueron las siguientes:

- Pubmed. Base de datos de revistas científicas de la biblioteca Nacional de Medicina de Estados Unidos. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>
- PubChem. Colección de información sobre compuestos químicos de libre acceso. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Science Database. Base de datos para ciencias generales y aplicadas. <https://search.proquest.com/sciencejournals?accountid=17225>

- EBSCOhost. Base de datos de información científica multidisciplinar. <https://www.ebsco.com/>
- SCOPUS. Base de datos de artículos científicos. <https://www.scopus.com/home.uri>
- Scielo (Scientific Electronic Library Online). Hemeroteca virtual conformada por una red de colecciones de revistas científicas. <https://scielo.org/>
- Google Académico. Buscador de Google de bibliografía más especializada. <https://scholar.google.es/>

El gestor bibliográfico utilizado fue Mendeley, su acceso es libre y permite referenciar y organizar los artículos científicos. www.mendeley.com.

Para gestionar las imágenes se emplearon dos software de libre distribución y código abierto: Gimp (<http://www.gimp.org.es/>) e Inkscape (<https://inkscape.org/>).

Con el fin de llevar a cabo la correcta representación gráfica de los resultados y el tratamiento estadístico de los datos, se usó el programa Graph Pad Prism versión 6.00 para Macintosh Operating System (Mac OS).

Los experimentos se realizaron por triplicado y se repitieron un mínimo de tres veces. En las correspondientes gráficas aparece representado el valor medio de los datos y mediante las barras de error, se expresa el error típico de la media, de al menos dos muestras independientes. La distinción entre los valores medios obtenidos fue estadísticamente significativa en $P < 0,05$ (*), $P < 0,01$ (**), $P < 0,001$ (***) según el test U de Mann-Whitney. Cuando los datos se presentan mediante imágenes, estas son representativas de los resultados obtenidos en al menos dos experimentos independientes.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El trabajo experimental inicial consistió en diseñar un conjunto de ensayos a fin de establecer cuáles son los microorganismos potencialmente sensibles a los productos naturales objeto de estudio de esta Tesis Doctoral. A este respecto, se escogieron un grupo de cepas pertenecientes a especies con demostrada capacidad patogénica, tanto entre las bacterias (organismos procariotas) como entre levaduras y hongos unicelulares, representantes de los eucariotas.

La información bibliográfica recogida mayoritariamente en los Antecedentes, proporcionan una evidencia consistente sobre la actividad antimicrobiana de las sustancias objeto de estudio: los extractos de propóleo y el ácido carnósico. En consecuencia, el primer paso lógico y necesario fue realizar los experimentos pertinentes que permitieran aseverar dicha información.

Respecto al uso de propóleo entre las preparaciones disponibles, el denominado extracto de propóleo P1 (de origen cubano) fue inicialmente descartado por tener una actividad antimicrobiana prácticamente indetectable en ensayos preliminares, tanto en bacterias como en hongos. Por ello, la mayoría de los ensayos que se muestran en la Memoria se realizaron con los extractos denominados P2 y P3, ambos de origen asiático. También se recogen ensayos preliminares con P5, una tintura comercial de propóleo de origen español (ver detalles de composición en el Apartado 3.1.3). En cuanto al ácido carnósico, se utilizó de forma rutinaria el extracto de riqueza 70-72% (CA) también descrito en el Apartado 3.1.3.

4.1 ENSAYOS PRELIMINARES DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL PROPÓLEO Y EL CA MEDIANTE ANTIBIOGRAMAS EN PLACA

4.1.1 Bacterias

Se han seleccionado un grupo de especies bacterianas por su gran relevancia clínica, representativas tanto de Gram(+) como de Gram(-). El ensayo cualitativo diseñado según el método de Kirby-Bauer, consistió en medir el diámetro del halo de inhibición generado por la presencia del compuesto estudiado. Como sustrato nutritivo para el cultivo bacteriano se ha utilizado el medio standard Mueller-Hinton dispensado en placas de Petri. Para otros detalles, consultar la sección 3.2. Métodos.

Pseudomonas aeruginosa

Esta bacteria está asociada a infecciones nosocomiales, trastornos genitourinarios y es bastante habitual en pacientes con grandes quemaduras. Muchas cepas de esta bacteria presentan resistencia a los agentes quimioterapéuticos convencionales debido a que contienen plásmidos con genes que codifican proteínas responsables de la resistencia (178).

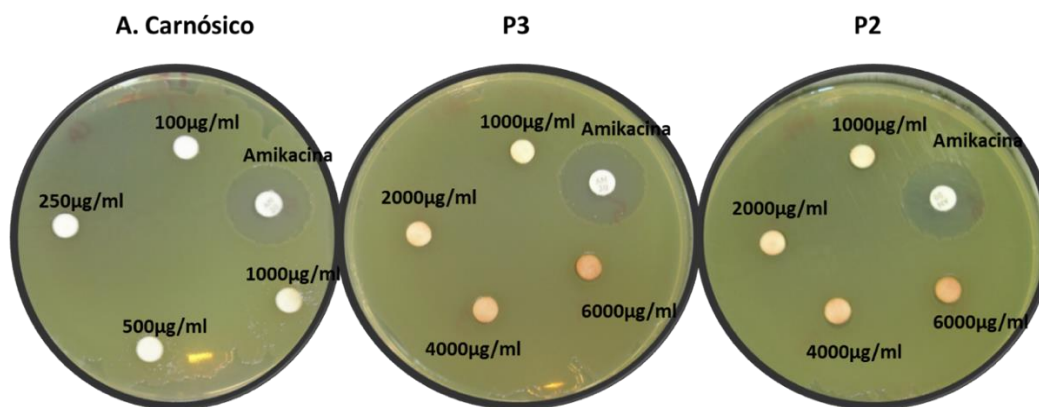


Figura 4.1. Antibiogramas con la bacteria Gram(-) *Pseudomonas aeruginosa*. Se han utilizado discos de 6 mm impregnados con cada uno de los extractos naturales, ácido carnósico y los dos propóleos seleccionados, P3 y P2, a las concentraciones especificadas en la imagen. Como control positivo antibacteriano se empleó Amikacina (40 µg/ml).

Como se aprecia, ni el ácido carnósico ni los propóleos desarrollaron una actividad inhibitoria reseñable sobre esta bacteria en el amplio rango de concentraciones utilizado, y sólo se observó un halo de inhibición en el ensayo control positivo (Amikacina). Es llamativo el contraste de color generado (en las placas y los discos con alta concentración de los compuestos), probablemente debido al color intrínseco de los propóleos. Este mismo hecho se puede observar en los sucesivos ensayos con otros microorganismos.

Escherichia coli

Este cocobacilo anaerobio facultativo es, entre otras cosas, el indicador universal de contaminación fecal. Está presente en el tracto digestivo del hombre y los animales homeotermos como hábitat natural, donde cumple un importante papel fisiológico sintetizando parte de las vitaminas E y K, necesarias para el organismo huésped, así como manteniendo un ambiente anóxico que impide la proliferación de otros patógenos. No obstante, algunas cepas enterotoxigénicas producen cuadros graves de diarrea infantil, junto con la denominada "diarrea del viajero" y otros episodios de infecciones urinarias. Ciertos serotipos pueden causar enfermedades con riesgo vital, como es el caso del "síndrome hemolítico urémico" (179).

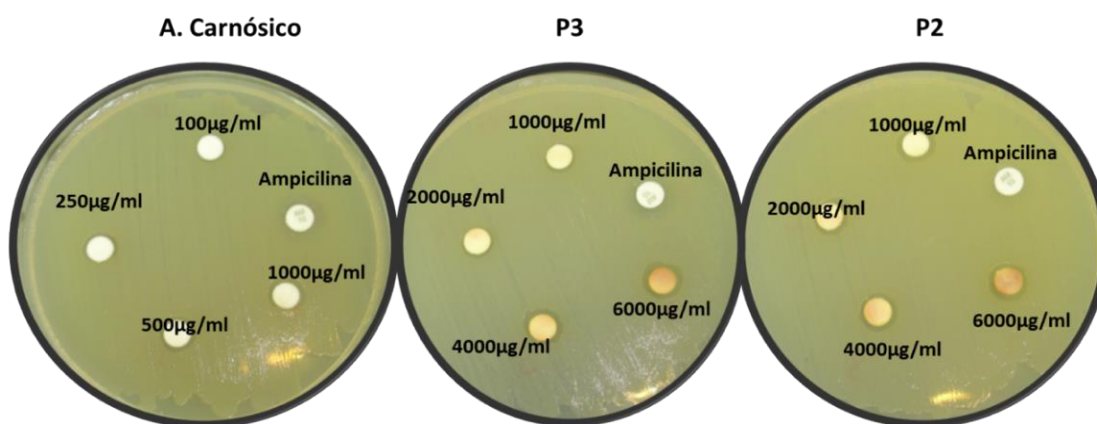


Figura 4.2. Antibiogramas utilizando discos de 6 mm sobre la bacteria Gram negativa *Escherichia coli* en las concentraciones especificadas de cada uno de los extractos naturales. Como control del ensayo se empleó Ampicilina (10 µg/ml).

Tampoco en esta importante bacteria Gram negativa se pudo apreciar actividad antimicrobiana significativa de los compuestos probados, ni siquiera en el ensayo en presencia de Ampicilina, utilizado en este caso como control positivo (Figura 4.2).

Staphylococcus epidermidis

Aunque este coco Gram(+) no tiene una incidencia clínica tan importante y frecuente como su especie afín, el *S. aureus*, se encuentra asociado con frecuencia a infecciones oportunistas, principalmente mediante la formación de biopelículas en prótesis médicas y catéteres intravenosos. Suele afectar a los pacientes sometidos a hemodiálisis (180). Se diferencia de *S. aureus* por ser coagulasa negativo, carecer de pigmentación y producir una cápsula externa de naturaleza polisacárida con función protectora frente a fagocitosis.

Los antibiogramas en placa con esta bacteria Gram(+) no revelaron halos de inhibición especialmente reseñables, aunque si se observó alguna acción débil. Este caso y de manera excepcional, se llevaron a cabo dos series, una con discos de 6 mm como hasta ahora y otra con discos de 13 mm por si este parámetro tuviera influencia en los resultados finales. Además, se utilizaron dos controles positivos diferentes: Ampicilina (10 µg/ml) y Piperacilina (100 µg/ml). Con los discos de diámetro habitual (6 mm, Figura 4.3), se observó una débil sensibilidad a las concentraciones más altas de ácido carnósico, que también parece apreciarse con los extractos de propóleo. Sin embargo, al introducir otros discos estériles de 13 mm con objeto de emplear cantidades mayores de los principios activos, el halo generado fue casi inapreciable (Figura 4.4). En este caso, se incluyó Piperacilina como antibiótico β-lactámico de control, porque apenas se registró sensibilidad de este coco frente a Ampicilina en la anterior (Figura 4.3).

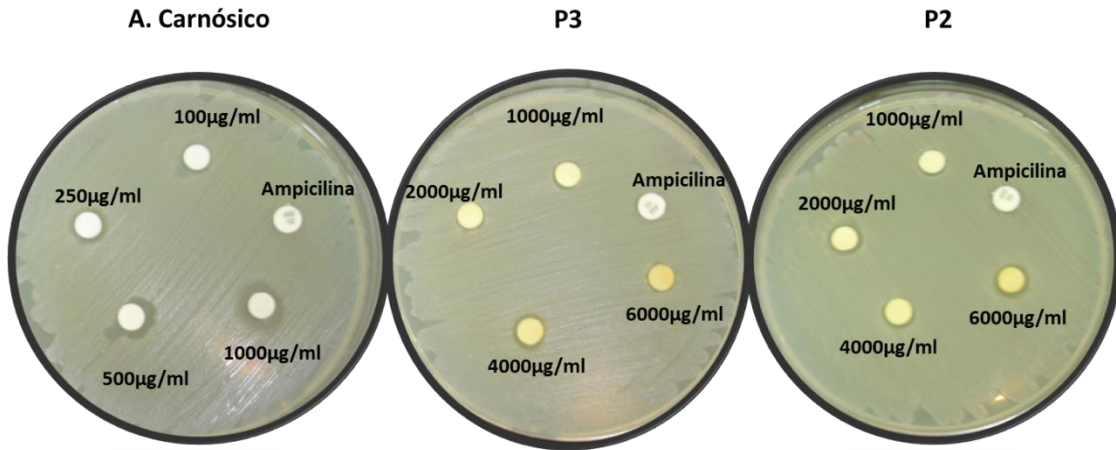


Figura 4.3. Antibiogramas con ácido carnósico y los propóleos P3 y P2 frente a la bacteria Gram (+) *S. epidermidis*. Se emplearon discos de 6 mm de diámetro y como control Ampicilina (10 µg/ml).

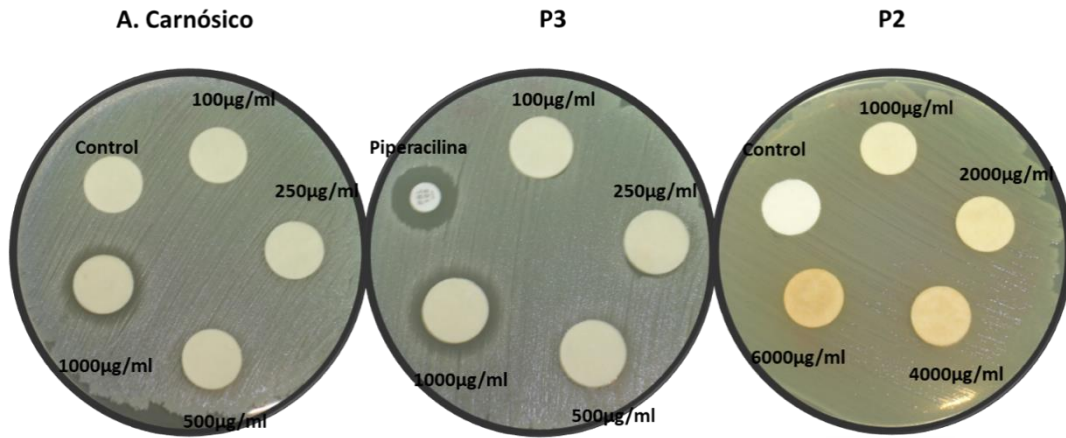


Figura 4.4. Antibiogramas con ácido carnósico y los propóleos P3 y P2 frente a *S. epidermidis*. Se emplearon discos de 13 mm de diámetro y como control un disco empapado en etanol 96% ya que es el disolvente utilizado para la preparación de las disoluciones de los extractos. También se aumentaron las concentraciones utilizadas en este segundo caso. Como control positivo se empleó otro antibiótico β-lactámico, en este caso la Piperacilina (100 µg/ml).

4.1.2. Hongos y Levaduras

Con una perspectiva histórica, los hongos han tenido una menor incidencia clínica que las bacterias como agentes responsables de patologías graves en el ser humano. Además, la mayoría de las infecciones fúngicas (micosis) suelen tener carácter secundario y oportunista, aprovechando una enfermedad previa de base. Así, el número de hongos patógenos es relativamente pequeño respecto al número de bacterias patógenas y la quimioterapia antifúngica ha tenido un menor desarrollo. Sin embargo, esta situación ha cambiado drásticamente en las dos últimas décadas debido al aumento de la población inmunocomprometida, ejemplificada por los pacientes de SIDA, los sujetos afectados de procesos crónicos y de hospitalización prolongada y aquellos que requieren cirugías agresivas o tratamientos con antibióticos prolongados con los consiguientes efectos secundarios (8,9,13,14).

Por otra parte, es preciso tener en cuenta que los hongos son organismos eucariotas y sus células comparten el mismo patrón básico de organización que los seres humanos. Por ello, se dispone de un arsenal más reducido de fármacos antifúngicos con relativa especificidad sobre el microorganismo respecto al paciente. Su nivel de citotoxicidad selectiva es muy bajo y, a menudo, desencadenan efectos secundarios graves sobre el hospedador (trastornos gástricos, hepáticos o renales, entre otros). En la actualidad, hay un gran interés en el desarrollo de nuevos compuestos antifúngicos que sean más seguros y en lo posible más eficaces. Por tanto, el estudio del efecto de nuestros productos en hongos con relevancia clínica es un objetivo principal en la presente Memoria.

Empezamos nuestro análisis con la levadura oportunista *Candida albicans*, el hongo de mayor prevalencia patológica entre la población humana y la cuarta causa de muerte por infecciones nosocomiales a nivel mundial. Una descripción pormenorizada de *C. albicans*, su biología y atributos de virulencia, ha sido ya presentada en la Introducción (5,9,15,21,22,180)

En los ensayos iniciales, se han utilizado como referencias tanto una cepa estándar de laboratorio (SC5314, Figura 4.5), como un aislado clínico de la cavidad oral (015, Figura 4.6), amablemente proporcionado por el Servicio de Microbiología del hospital "La Fe" de Valencia. El protocolo de realización de antibiogramas fue similar al utilizado hasta ahora, salvo en el hecho de que en estas series se ha sustituido el uso de discos estériles impregnados con el antifúngico por la de formación de pocillos con sacabocados de 6 mm

realizados en el medio Mueller-Hilton, en cuyo interior se depositó una disolución de los antifúngicos para mejorar la difusión del compuesto. Además, por primera vez y debido a ensayos preliminares se muestra la aplicación conjunta de propóleo y CA.

Candida albicans (SC5314)

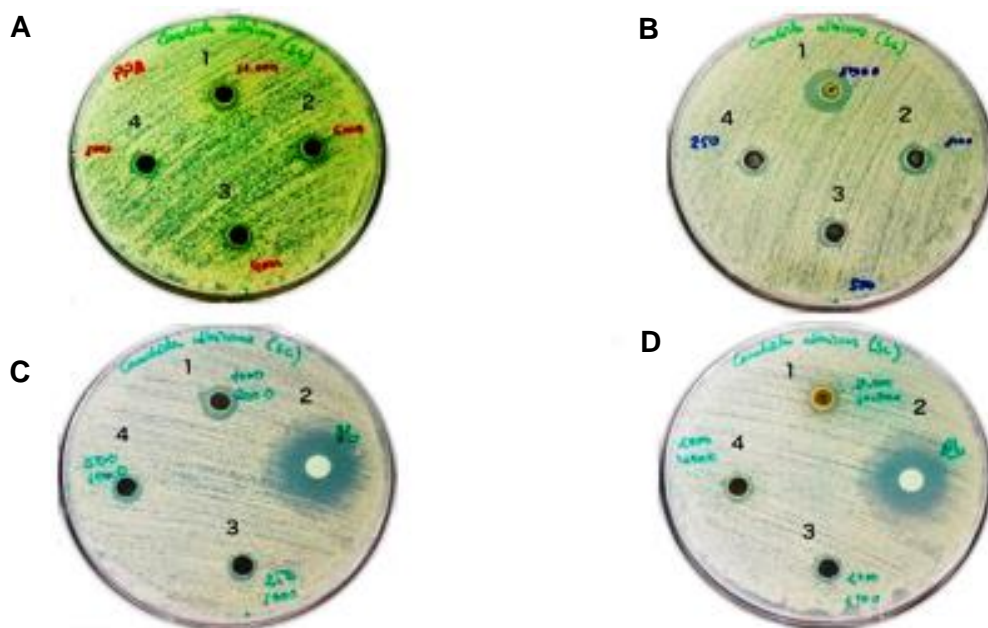


Figura 4.5. Antibiogramas de la cepa *C. albicans* SC5314, utilizando las fuentes de sustancias naturales con posible efecto antimicrobiano: P3 (A), CA (B); así como combinaciones de ambos a concentraciones “bajas” (C) y “elevadas” (D). Como control se incluyó el antifúngico Micafungina (200 µg/ml) (Ab). Las concentraciones utilizadas se recogen en la Tabla 4.1

Tabla 4.1. Concentraciones de CA y P3 (µg/ml) utilizadas en los experimentos de los antibiogramas de la Figura 4.5 y Figura 4.6.

| Pocillo | Disco A (P3) | Disco B (CA) | Disco C (CA:P3) | Disco D (CA:P3) |
|---------|--------------|--------------|-----------------|-----------------|
| 1 | 10.000 | 10.000 | 1.000:2.000 | 10.000:10.000 |
| 2 | 6.000 | 1.000 | Control | Control |
| 3 | 4.000 | 500 | 250:1.000 | 1.000:1.000 |
| 4 | 1.000 | 250 | 500:1.000 | 1.000:4.000 |

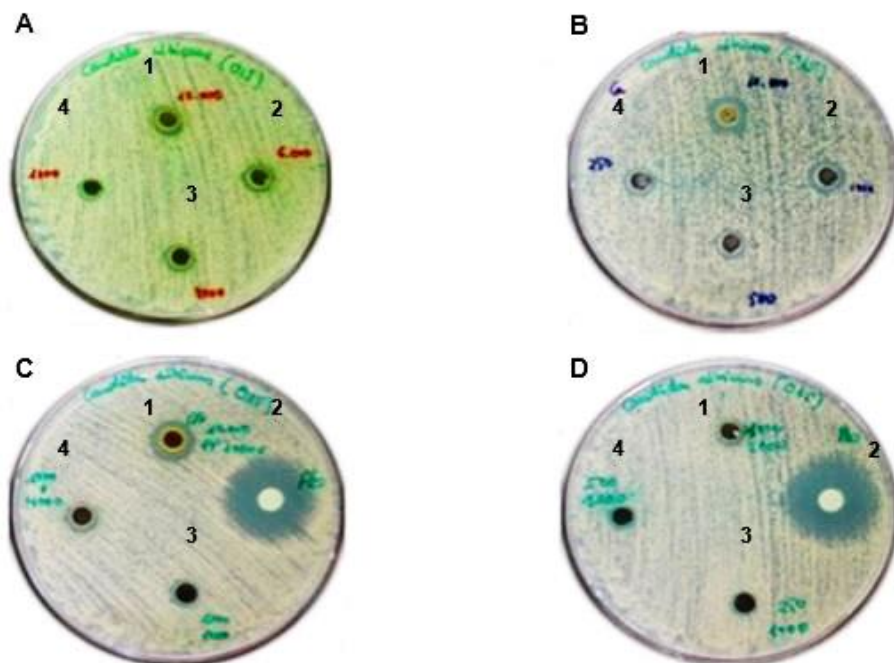


Figura 4.6. Ensayo de sensibilidad en placa idéntico al mostrado en la figura anterior, excepto que ha sido realizado con la cepa clínica 015. En la imagen A se empleó P3, en la B CA y en C y D combinaciones de ambos, siendo las concentraciones utilizadas las detalladas en la Tabla 4.1. Como control positivo se utilizó también Micafungina (200 µg/ml).

En ambas cepas (laboratorio y clínica), la capacidad antifúngica de los extractos individualmente utilizados o en combinación y a distintas concentraciones es visible pero limitada, frente al halo de inhibición obtenido en presencia de Micafungina. Se aprecian pocas diferencias realmente significativas al variar la concentración o al utilizar ambos compuestos conjuntamente, aunque en determinados casos se observan débiles halos de inhibición.

La técnica de antibiograma sirvió para realizar un cribado inicial, pero es un procedimiento eminentemente cualitativo y no permite obtener resultados cuantitativos precisos. Además, los datos pueden variar en función del dispositivo usado: sacabocados o discos. Dejando a un lado las características del método empleado, las evidencias hasta ahora aportadas parecen indicar que los hongos, a diferencia de las bacterias tanto Gram (+) como Gram (-), muestran una mayor sensibilidad a los compuestos analizados.

En consecuencia, y teniendo en cuenta tanto nuestros primeros resultados como los antecedentes bibliográficos existentes sobre actividad antifúngica del propóleo y del ácido carnósico, se entendió que el siguiente paso consistía en realizar un estudio experimental

más pormenorizado escogiendo el análisis del potencial efecto del propóleo y del ácido carnósico sobre hongos patógenos antes que sobre las bacterias, por tener la percepción de que los primeros eran más susceptibles que las segundas. A tal efecto, se llevaron a cabo nuevos ensayos con dos especies representativas de los hongos patógenos: *Candida albicans* (ascomiceto) y *Cryptococcus neoformans* (basidiomiceto). Se empezó con *C. albicans*, manteniendo las dos cepas previamente seleccionadas: SC5314, utilizada como referencia por los más importantes laboratorios, así como en la construcción génica de numerosos mutantes, y la cepa 015 proveniente de un aislado clínico de la cavidad oral.

4.2 MEDIDAS CUANTITATIVAS DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE PROPÓLEO Y ÁCIDO CARNÓSICO

Realizados los ensayos preliminares, se consideró necesario llevar a cabo experimentos que permitieran cuantificar el efecto del propóleo y del CA. Esencialmente, se realizaron series de experimentos de la siguiente naturaleza:

- Determinación de la viabilidad celular en medio YPD líquido y ensayo de formación de colonias macroscópicas en medio YPD sólido. Ambos se complementan, ya que el primero es cuantitativo mientras que el segundo utiliza alícuotas de los mismos cultivos, aunque tiene un significado sólo semicuantitativo.
- Establecimiento de las correspondientes concentraciones mínimas inhibitorias (MICs), definidas como las concentraciones mínimas del antifúngico necesarias para inhibir la proliferación de un inóculo estandarizado según protocolo EUCAST.
- Observación de las alteraciones morfológicas producidas mediante micrografías al microscopio óptico de contraste de fases, incorporando la técnica del contraste de interferencia diferencial de Nomarski (ver Apartado 3.2.6).

4.2.1 Ensayos sobre *Candida albicans*

➤ Efecto de propóleo sobre la viabilidad celular

Ya se ha comentado en el capítulo de Antecedentes la enorme heterogeneidad en la composición de los propóleos comercialmente disponibles. Por ello, se realizó un primer cribado de actividad *anticandida* específica con extractos de distinta procedencia, siendo escogidos como potenciales candidatos los dos propóleos de origen asiático (China), denominados respectivamente, P2 y P3 (ver Apartado 3.1.3). Ambos mostraron la mayor actividad fungicida de todos los probados, especialmente respecto al cubano, prácticamente ineficaz. Los datos de su aplicación se documentan en los apartados siguientes.

En primer lugar, se analizó el potencial antifúngico correspondiente al propóleo P2 sobre la cepa SC5314. Los resultados y detalles de dilución se recogen en la Figura 4.7. Como

puede observarse, tan sólo a la mayor dosis de P2 empleada (1.000 µg/ml) se produjo una reducción significativa de la viabilidad celular muy similar a la provocada por el antifúngico control, que en este caso fue la anfotericina B (AmB) (0,5 µg/ml).

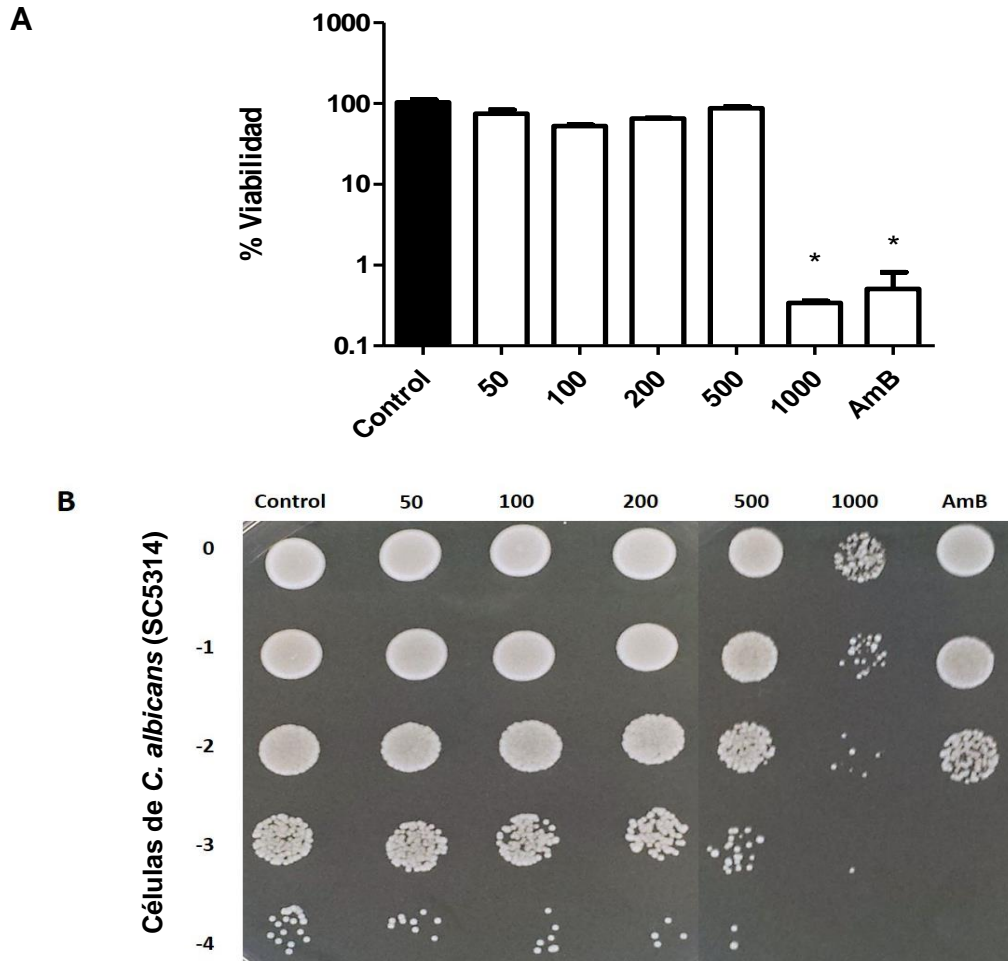


Figura 4.7. A). Ensayo de viabilidad en medio líquido con la cepa estándar SC5314 de *C. albicans* a diferentes concentraciones del P2: 50, 100, 200, 500 y 1.000 µg/ml. Como control de crecimiento se utilizó una muestra sin tratar, y como control antifúngico positivo se empleó AmB (0,5 µg/ml). Se partió de un preinóculo incubado toda la noche a 30°C; al día siguiente se refrescó en medio YPD hasta una $DO_{600} = 0,3$. El cultivo se dejó crecer a 37°C hasta $DO_{600} = 0,8-1$ y en ese momento se añadió el propóleo o la AmB, incubado 1 h a la misma temperatura. A partir del cultivo, se realizaron distintas diluciones seriadas en agua estéril, desde 10^{-1} (-1 en la figura) hasta 10^{-4} (-4). Se dispensaron en placas por triplicado, calculando los valores promedio y el porcentaje de supervivencia se refirió a la muestra control sin tratar, que representa el 100% de viabilidad. B) Imagen del ensayo de formación de colonias en medio YPD sólido o diluciones seriadas en gota (también llamados “spots”), obtenidos tomando alícuotas del cultivo original (las mismas que en la Figura 4.7A). Las placas se incubaron a 37°C durante 24 h antes de ser fotografiadas. Para otros detalles de metodología consultar los Apartados 3.2.3 y 3.2.4.

A continuación, se llevó a cabo el mismo ensayo con el propóleo P3 siguiendo el mismo procedimiento experimental. Los resultados se muestran en la Figura 4.8

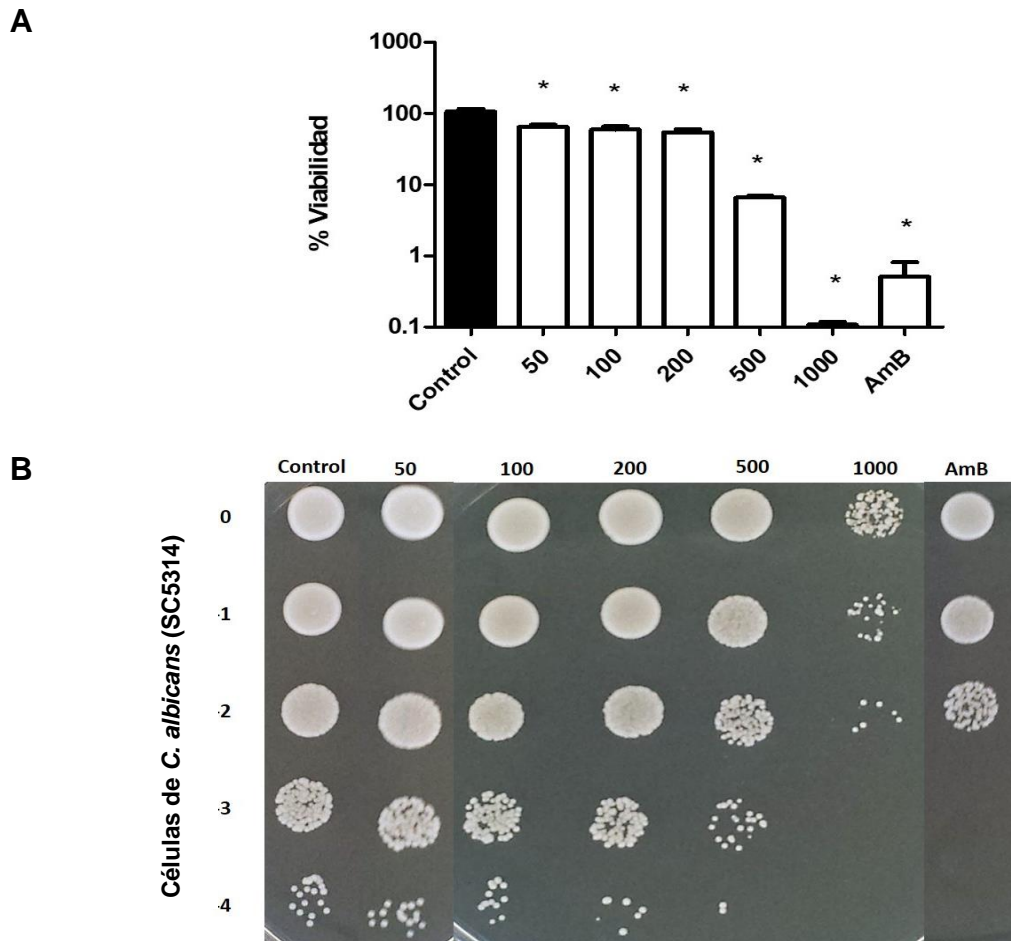


Figura 4.8. Ensayo análogo al presentado en la Figura 4.7 con *C. albicans* (SC5314) utilizando P3 en lugar de P2. Para la explicación del protocolo seguido, consultar la leyenda de dicha figura.

En este caso, se aprecia un grado de inhibición importante a la concentración de 500 µg/ml, mientras la dosis de 1000 µg/ml mostró una disminución de la viabilidad muy potente (situándose la supervivencia en torno al 0,1%), incluso menor del efecto de la adición de AmB. Por tanto, podemos concluir, al menos preliminarmente, que el propóleo P3 presenta una mayor efectividad fungicida, que se traduce en la reducción más acusada de la viabilidad celular respecto al obtenido con el propóleo P2.

Se decidió verificar estos resultados extendiendo el estudio a la cepa clínica de *C. albicans* 015. En las Figura 4.9 (usando P2) y Figura 4.10 (usando P3) se muestran las series de viabilidad análogas a las anteriores.

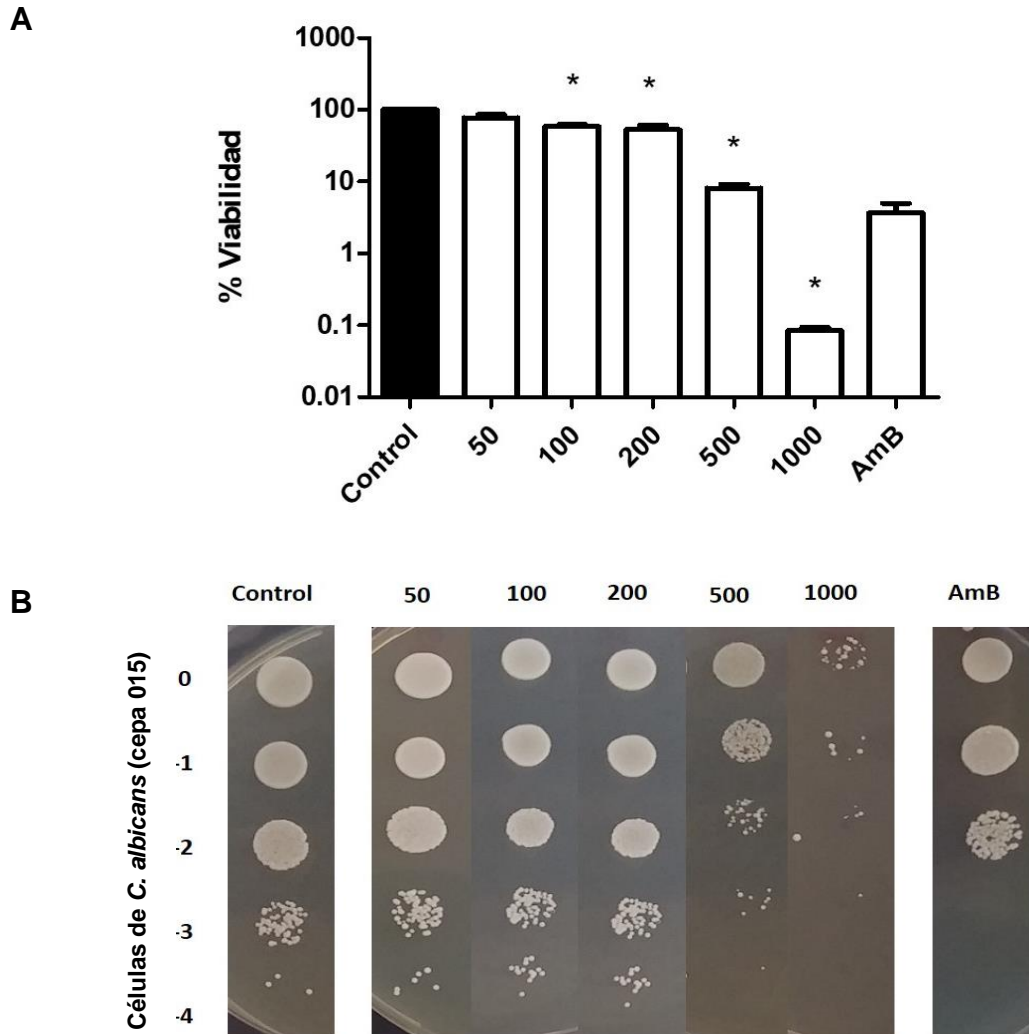
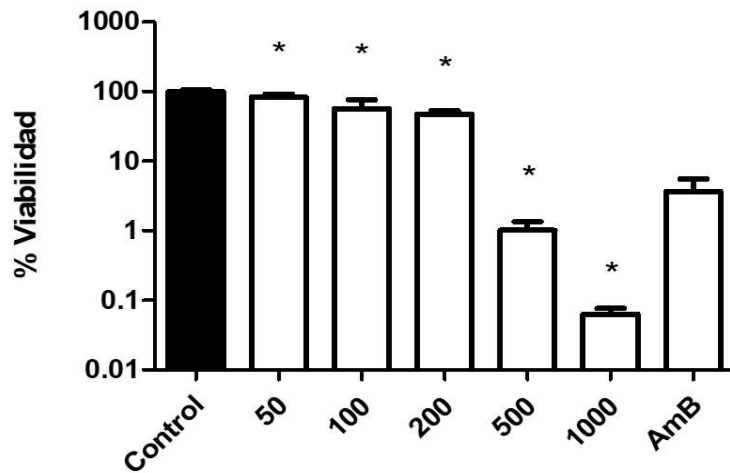


Figura 4.9. A) Ensayo de viabilidad en medio líquido con la cepa 015 de *C. albicans* a diferentes concentraciones de P2. B) Ensayo de formación de colonias macroscópicas en medio YPD sólido. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 h antes de ser fotografiadas. Otros detalles descritos en la Figura 4.7.

A



B

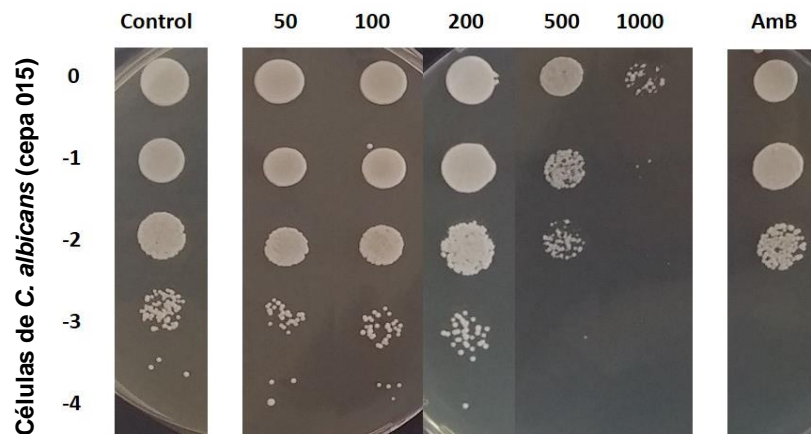


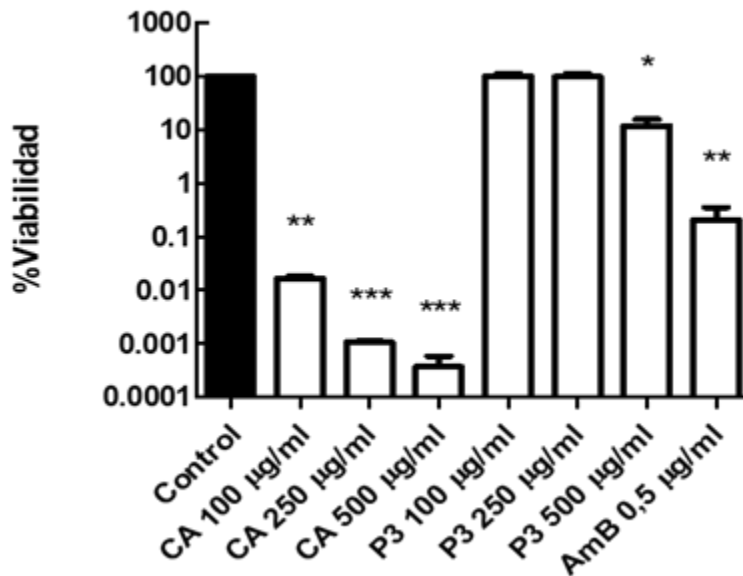
Figura 4.10. Ensayo análogo utilizando P3 y la cepa 015. Para más información, consultar las leyendas de la Figura 4.7.

Este doble ensayo comparativo puso de manifiesto resultados similares entre ambas cepas. También reveló una elevada correlación entre los ensayos de viabilidad en medio líquido y de crecimiento colonial en medio sólido. Además, se confirmó que P3 mostraba una mayor capacidad antifúngica que P2. Por tanto, se decidió utilizar este propóleo P3 como la preparación de referencia para sucesivos experimentos.

➤ **Efecto del ácido carnósico sobre la viabilidad celular**

A continuación, se estudió el potencial antifúngico del otro componente natural, el CA, comparándolo en paralelo con el propóleo P3, recién seleccionado, utilizándose un rango muy amplio de concentraciones de CA. Como se muestra en la Figura 4.11, el ácido carnósico causó un marcado descenso de la viabilidad celular en *C. albicans*, que fue proporcional a la dosis empleada y claramente perceptible incluso a la concentración más baja ensayada (100 µg/ml); mientras el propóleo P3 no produjo *per se* efectos relevantes, excepto a la dosis previamente utilizada de 500 µg/ml (Figura 4.8 y Figura 4.10) y aun así, el resultado dista bastante del efecto fungicida obtenido con sólo 100 µg/ml de CA. Por tanto, se puede concluir de modo preliminar que el CA tiene un efecto fungicida sobre *Candida albicans* claramente superior al del propóleo, que se traduce en un mayor grado de reducción de la viabilidad celular.

A



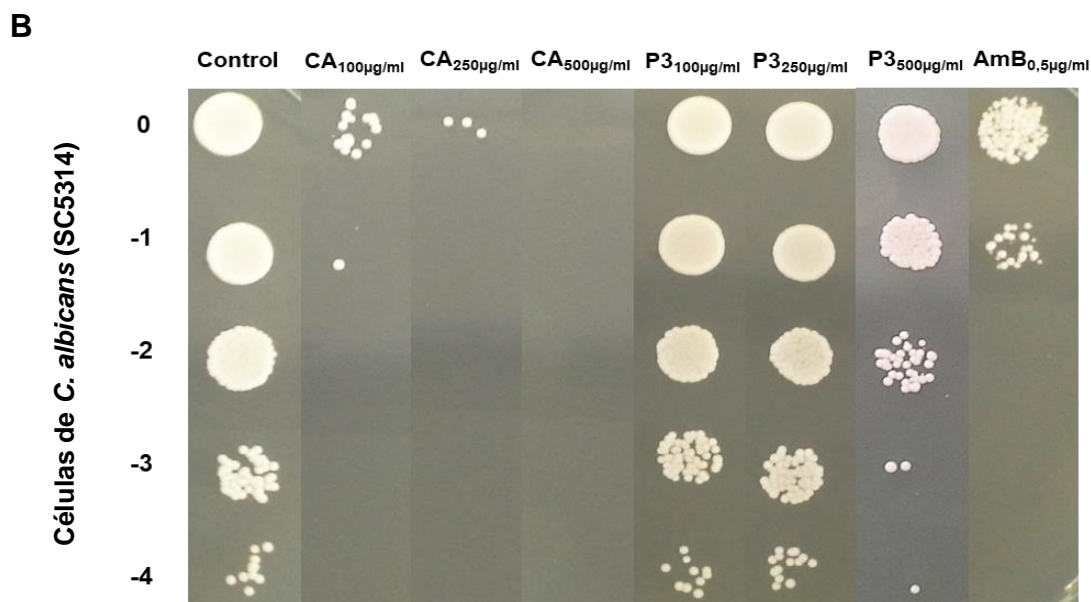


Figura 4.11. Ensayo de viabilidad en medio YPD líquido (A) y formación colonial (B) con la cepa estándar SC5314 de *C. albicans* utilizando un rango de concentraciones de ácido carnósico y propóleo P3. Para otros detalles del ensayo ver Figura 4.7.

➤ Observaciones microscópicas de la morfología celular

Para este estudio morfológico, se utilizaron muestras celulares que una vez sometidas al tratamiento, se fijaron con formalina y se mantuvieron a 4°C hasta su examen microscópico. A este nivel, se observó una mayor granularidad en las muestras celulares expuestas al propóleo P3 con relación al control no tratado. La presencia de CA, tanto solo como combinado con P3, provocó además del aumento de la granularidad celular mencionado, una reducción significativa del tamaño de las células.

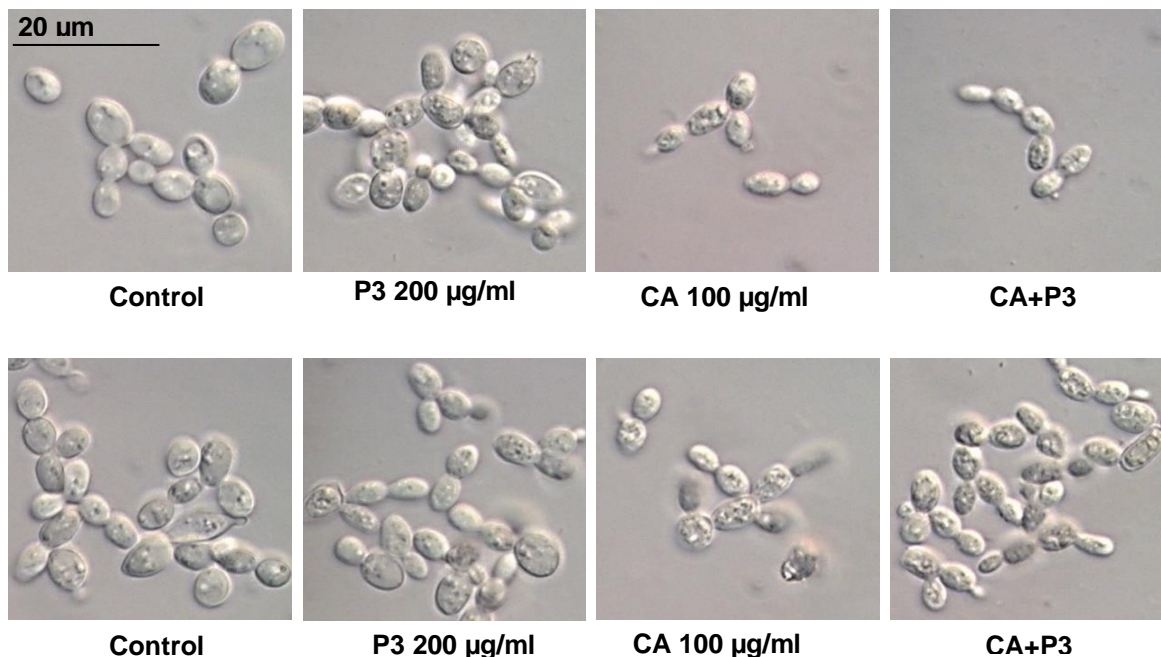


Figura 4.12. Inspección de la morfología celular mediante microscopía óptica, aplicando el contraste interferencial de “Nomarski” sobre levaduras (blastoconidios) de *C. albicans* (SC5314), tratadas con: P3 (200 µg/ml), CA (100 µg/ml) y una combinación de ambos. Las imágenes de la fila superior corresponden a un tiempo de tratamiento de 3 h y las de la fila inferior corresponden a un tiempo de 5 h.

En otro campo óptico, se observó como la adición de ácido carnósico (100 µg/ml) provocó cierto hinchamiento celular (Figura 4.13). La fotografía de las células sometidas a una mayor concentración de CA (500 µg/ml) muestra un grupo de células donde se aprecia como el tratamiento con dosis crecientes de ácido carnósico provocó alteraciones visibles en la morfología celular, dando lugar a células de aspecto más hinchado y deforme, con aumento de la refringencia y pérdida aparente de la capacidad de transición dimórfica a estructuras miceliares (hifas).

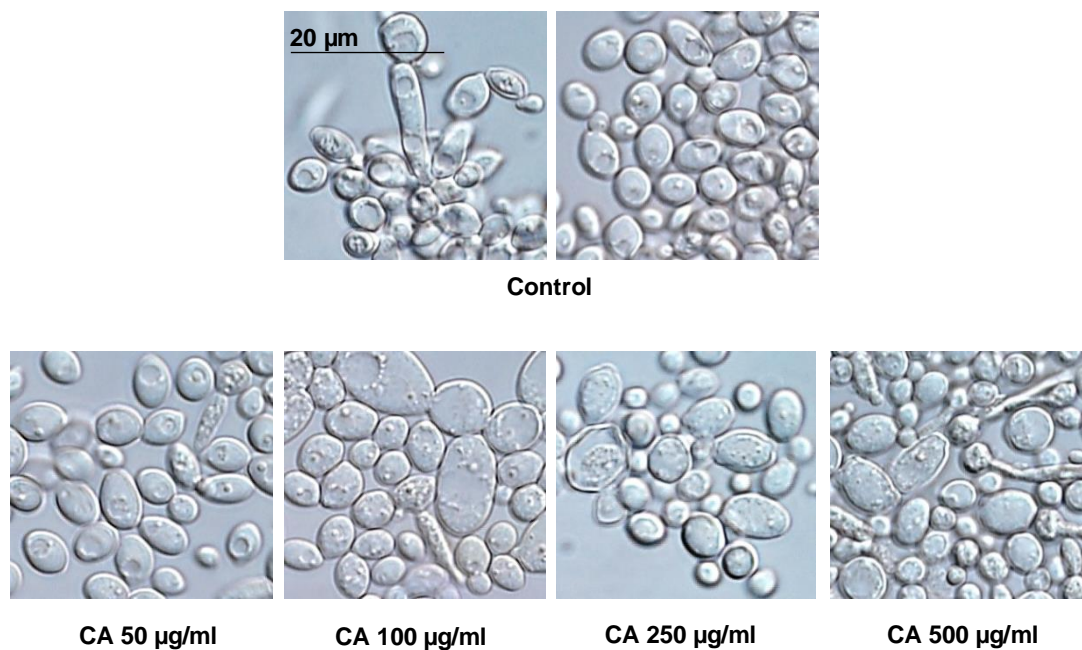


Figura 4.13. A) Micrografías ópticas de células de *C. albicans* (SC5314) tratadas con CA a diferentes concentraciones. Se utilizó un microscopio óptico con el contraste de interferencia diferencial de Nomarski.

En relación con la transición levadura-micelio, proceso íntimamente relacionado con la virulencia de *Candida* (5,181), se observó como las células control y las expuestas a la menor concentración de ácido carnósico experimentaron un alto porcentaje de filamentación (hifas agrupadas constituyendo un micelio) que se fue reduciendo de forma proporcional al aumentar la dosis del agente.

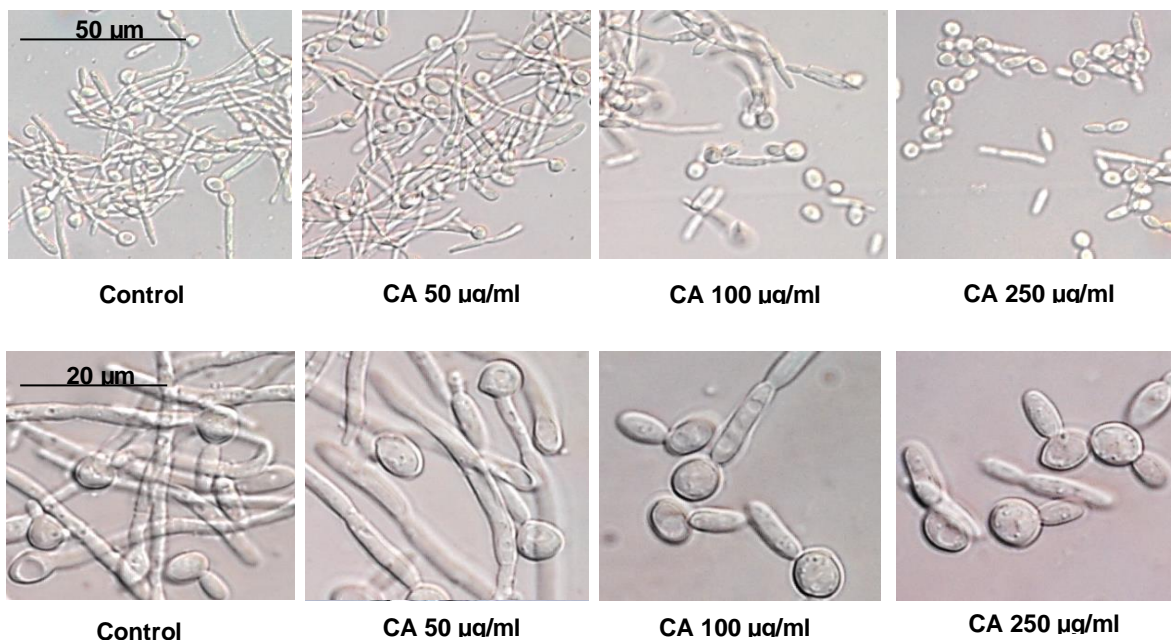


Figura 4.14. Micrografías ilustrativas del efecto del ácido carnósico sobre el dimorfismo de *C. albicans* (SC5314). Algunas células experimentaban una hinchazón creciente tras el tratamiento con ácido carnósico a partir de 100 µg/ml. El cambio dimórfico fue inducido mediante adición de suero humano según se describe en el Apartado 3.2.5.

➤ Cálculo de las MICs del P3 y del CA

En el marco de nuestro estudio, resulta fundamental poder comparar la capacidad antifúngica de estos compuestos con el resto de antimicrobianos presentes en el mercado. Para ello, existen diversas técnicas ampliamente utilizadas por la comunidad científica, como el cálculo de las concentraciones mínimas inhibitorias sobre una población celular inicial de un porcentaje dado; siendo el 50% (MIC₅₀) o 100% (MIC₁₀₀) los parámetros más habituales (182). Lógicamente cuanto mayor poder antimicrobiano posea el antifúngico en cuestión, menor concentración necesaria para eliminar un porcentaje concreto de células.

Existen diversos métodos de determinación de las MICs pero los más utilizados siguen el método del CLSI (USA) o el método EUCAST (Europa), ambos validados internacionalmente (182,183). En este caso y dadas las características especiales de coloración intrínseca que poseen tanto CA como P3, se decidió utilizar el método EUCAST cuyo protocolo está descrito en el Apartado 3.2.7. En la Tabla 4.2 se recogen las MICs del CA y del P3 para las distintas cepas de *C. albicans*:

Tabla 4.2. Concentraciones Mínimas Inhibitorias (MICs) de CA y P3 ($\mu\text{g/ml}$) determinadas a las 24 h según el método EUCAST. Se calculó el valor de MIC₅₀ referente a la inhibición del 50% del crecimiento celular. Se han probado los efectos sobre las dos cepas de *C. albicans*: SC5314 y 015 incluyendo un control del crecimiento (CC*).

| Compuesto | CC* | MIC ₅₀ |
|-----------|-----|-------------------|
| SC5314 | | |
| CA | + | 125 |
| P3 | + | 250 |
| 015 | | |
| CA | + | 125 |
| P3 | + | 250 |

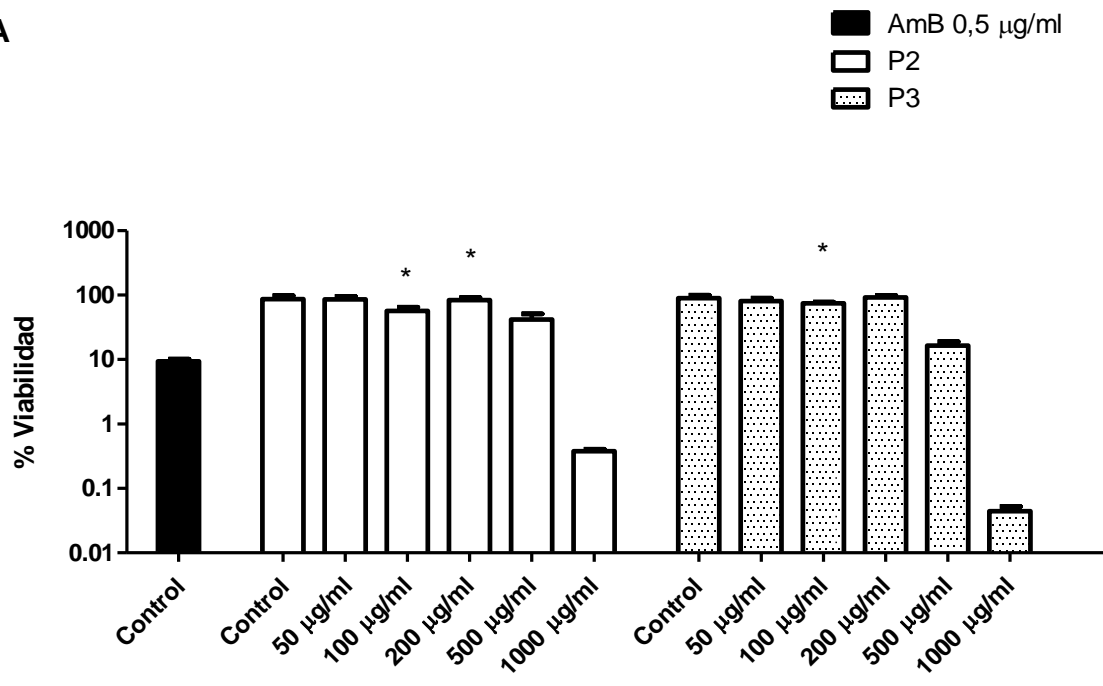
4.2.2 Ampliación del estudio a otros hongos: *Cryptococcus neoformans*

El otro hongo seleccionado como modelo de estudio en la presente Tesis fue *C. neoformans* por tratarse de un patógeno con una incidencia clínica muy significativa, especialmente en pacientes inmunodeprimidos (24). Posee otras diferencias estructurales relevantes detalladas en los antecedentes de la Memoria. Se ha utilizado la cepa silvestre de referencia H99 que facilita posibles comparaciones con otros hongos. La cepa ha sido amablemente cedida por el Dr. O. Zaragoza (ver Apartado 3.1.2).

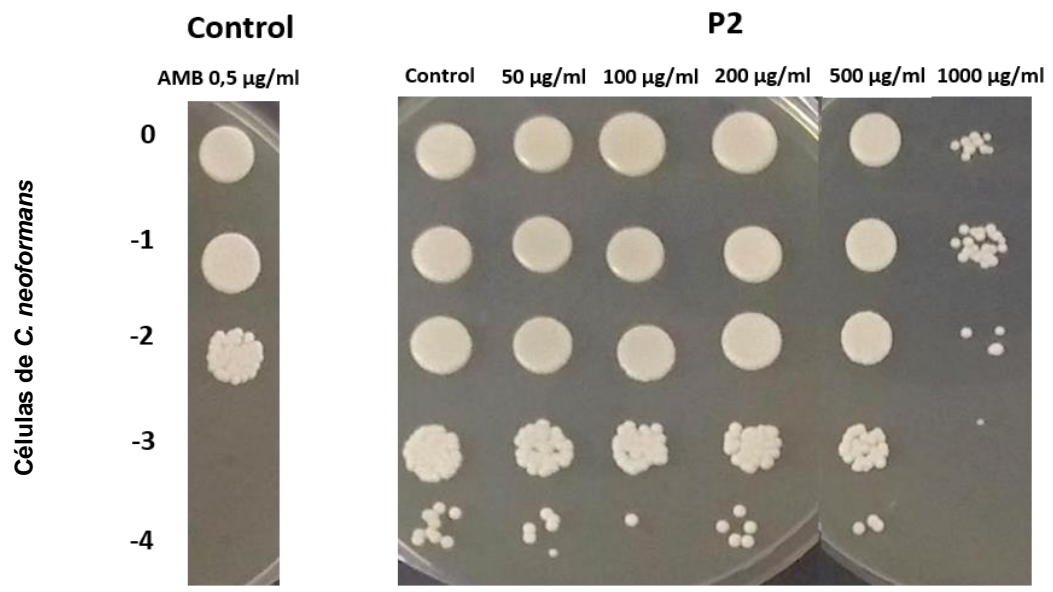
➤ Ensayo de propóleo sobre la viabilidad celular

Inicialmente, se llevaron a cabo los correspondientes ensayos de viabilidad con *C. neoformans* siguiendo el protocolo experimental idéntico al diseñado para *Candida albicans*. Se analizó el efecto tanto del CA como de los dos propóleos chinos, P2 y P3, para comprobar su hipotética capacidad antifúngica sobre esta especie, utilizando también las mismas técnicas de recuento de viables y MICs, con un control positivo de Anfotericina B (AmB) (184). En este caso, los ensayos realizados con los dos propóleos en medio líquido se presentan agrupados en la misma gráfica (Figura 4.15).

A



B



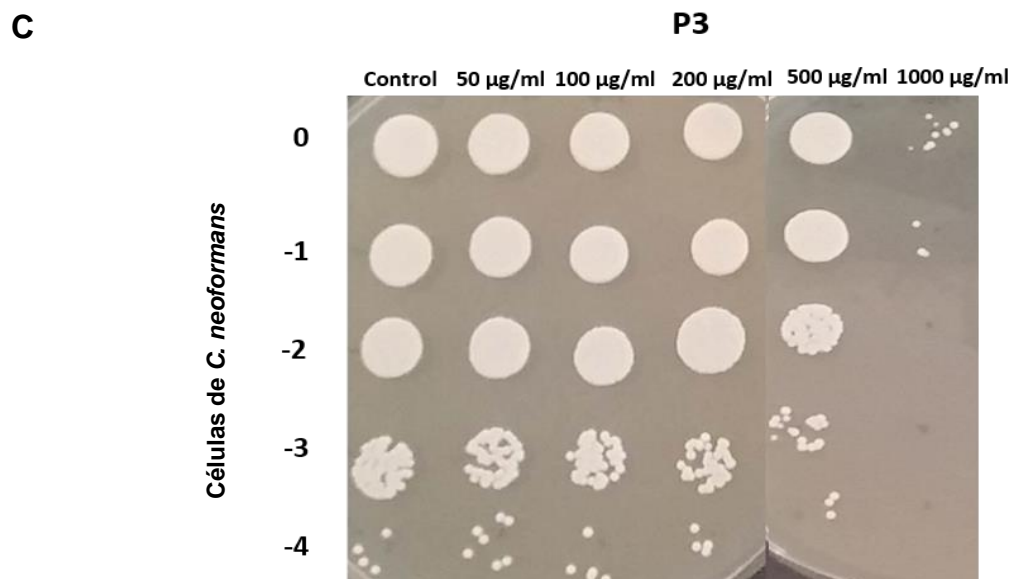


Figura 4.15. A) Ensayo de viabilidad en medio líquido de los propóleos P2 y P3 a las concentraciones indicadas (50, 100, 200, 500 y 1.000 µg/ml) sobre *C. neoformans* en crecimiento exponencial. Se incluyó un control antifúngico positivo (AmB; 0,5 µg/ml). B) y C) Ensayos de formación de colonias macroscópicas en medio YPD sólido. Las placas se incubaron durante 48 h antes de ser

Los datos confirman que la acción fungicida del propóleo P3 es más eficaz que la de P2, como ocurría con la otra levadura patógena. No obstante, hasta no alcanzar 500 µg/ml no se observó una débil pero apreciable acción fungicida, siendo la concentración de 1.000 µg/ml la que ya produjo una reducción notable de la viabilidad celular en ambos casos.

➤ Cálculo de las MICs de P3 y CA

De forma análoga al procedimiento realizado para la determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias de *C. albicans*, se calcularon las correspondientes MICs para *Cryptococcus neoformans*.

Tabla 4.3. Concentraciones Mínimas Inhibitorias (MIC, $\mu\text{g/ml}$) de CA y P3 frente a *C. neoformans*, determinadas a las 48 h según el método EUCAST. Se calcularon las MIC₅₀ y se incluyó un control de crecimiento (CC*).

| Compuesto | CC* | MIC ₅₀ |
|------------|-----|-------------------|
| <i>H99</i> | | |
| CA | + | 62,50 |
| P3 | + | 62,50 |

En resumen, los datos disponibles indican que la viabilidad de los dos hongos patógenos escogidos como modelo resultó moderadamente afectada por los productos estudiados (los propóleos y el CA) aunque la efectividad antifúngica conseguida es bastante menor a la inducida por los antifúngicos de aplicación clínica (la Anfotericina B y otros polienos) (43,45,184). Sin embargo, de estos datos cuantitativos se desprende cierta controversia. Por ejemplo, los datos de MIC recogidos en la Tabla 4.3 muestran ciertas contradicciones al compararlos con los correspondientes a la viabilidad mostrados en la Figura 4.15. En concreto, y referido a *C. neoformans*, el propóleo P3 parece tener un mayor poder antifúngico que el CA, y además las MIC para *C. neoformans* son más bajas respecto a las calculadas en *C. albicans*, lo que no es congruente con los ensayos de viabilidad mostrados anteriormente. Estas aparentes contradicciones pueden estar relacionadas con los protocolos para la determinación de los ensayos de viabilidad y de determinación de las MICs. Ambos tipos de ensayos siguen una metodología distinta, ya que las MICs para este hongo se leen transcurridas 48 h de la adición de los antifúngicos por tener un menor ritmo de crecimiento que *Candida*, mientras que la viabilidad (y la formación de colonias macroscópicas) es medida después de 1 hora. La exposición más o menos prolongada puede ser un factor crucial para estudios de sensibilidad (ver más adelante cinética de los efectos). Por último, destacar que los medios de cultivo también difieren en ambos casos.

4.2.3 Estudio de actividad antifúngica de la combinación de P3 y CA sobre *Candida albicans*

Una vez estudiada la capacidad del propóleo y del CA “*per se*” para actuar con cierta efectividad sobre los hongos escogidos como modelo por su alta incidencia en infecciones humanas, se estudió el efecto conjunto, ya que se necesitan concentraciones relativamente altas de ambos para obtener efecto antifúngico notable. Tal y como sucede en algunas de las formulaciones de terapia combinada ya existentes (185), se pensó que ambos extractos podrían tener algún tipo de interacción entre sí que incrementara el efecto observado para cada extracto de forma aislada. Por ello, se llevaron a cabo experimentos con los mismos procedimientos previamente descritos, pero incluyendo una combinación de ambos.

Se ensayó como primer microorganismo *C. albicans*, utilizando las dos cepas descritas. En principio, las concentraciones de los compuestos naturales se seleccionaron en función de ensayos previos, tomando como punto de partida una relación preferencial 1:4 (CA:Propóleo). La razón para elegir esta relación fue doble. De una parte, al ser el CA el que normalmente presenta mayor potencial antimicrobiano a igual concentración (peso/volumen) que el propóleo, era preferible que fuera el componente en menor cantidad en la mezcla. Por otra parte, y dado el carácter industrial de esta Tesis, se trató de reducir en lo posible la dosis de CA por tener un coste como materia prima muy superior al del P3, por lo que se mejora la viabilidad económica del potencial antifúngico. Además de seleccionar esta relación 1:4, se decidió también utilizar concentraciones de acción inhibitoria parcial de cada agente. De acuerdo con ello, las dosis iniciales elegidas fueron 50 µg/ml de CA y 200 µg/ml de P3, que tienen un efecto sobre la levadura moderado. El objetivo era, tanto en el caso de que se diera una acción simplemente aditiva como si se produjera una interacción positiva más allá de la simple suma, poder detectar adecuadamente la magnitud de ésta.

➤ Efecto sobre la viabilidad en medio líquido

Así pues, se llevaron a cabo experimentos de viabilidad en medio líquido y de formación macroscópica de colonias por goteo en placa (“spots”) comparándolos con el efecto de cada componente aislado.

SC5314

Además de la acción conjunta a las concentraciones 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de CA y 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de P3, se monitorizó simultáneamente la cinética de inhibición de la viabilidad celular. El estudio del efecto del tiempo de exposición en la viabilidad celular se introdujo para explorar la duración de los efectos observados por las discrepancias entre los altos valores de MIC encontrados y comentados anteriormente, que podrían estar relacionadas con el tiempo de acción del agente o su estabilidad (ver Apartado 4.2.2). En estas series, se prepararon varias alícuotas procedentes de un único cultivo exponencial y, por tanto, el estado fisiológico de las células fue siempre idéntico. Se procedió a medir la viabilidad celular tras la exposición con el agente antifúngico, individual o combinado, transcurridas 1, 3 o 5 horas. Los resultados se muestran la Figura 4.16. Además de los efectos esperables pero pequeños del CA y el P3 por separado, lo verdaderamente destacable fue el importante grado de muerte celular en *C. albicans* (hasta cinco órdenes de magnitud tras 1 h de tratamiento) en las muestras expuestas a la mezcla conjunta de CA y P3. La combinación de los dos agentes (en relación 1:4, como se explicó anteriormente) provocó una dramática pérdida de la viabilidad de esta cepa de *C. albicans*, llegando a eliminar casi por completo la población celular tras la primera hora de aplicación de la mezcla (A). Sin embargo, el efecto tendió a ser menos efectivo a tiempos de exposición mayores (3 y 5 h). En cualquier caso, estos resultados indicaban de forma concluyente que la magnitud del daño resultante de dicha combinación es mucho mayor que la simple suma debida al efecto aditivo de ambos extractos para cada uno de los tiempos de exposición.

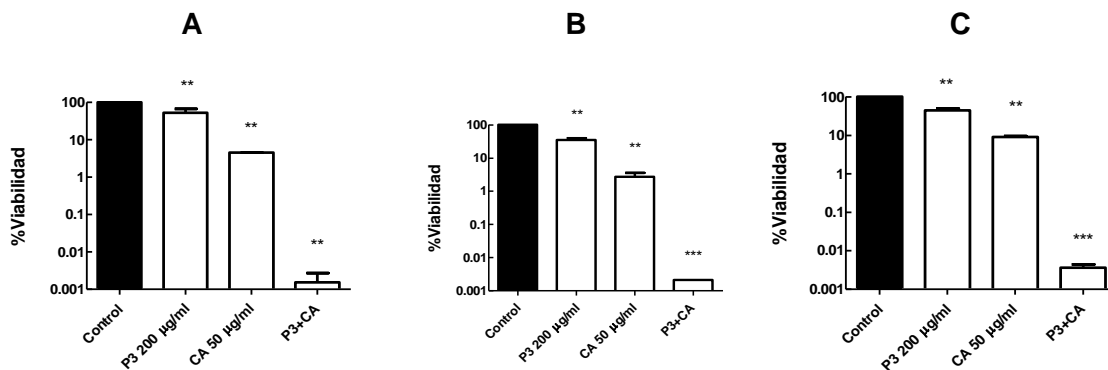
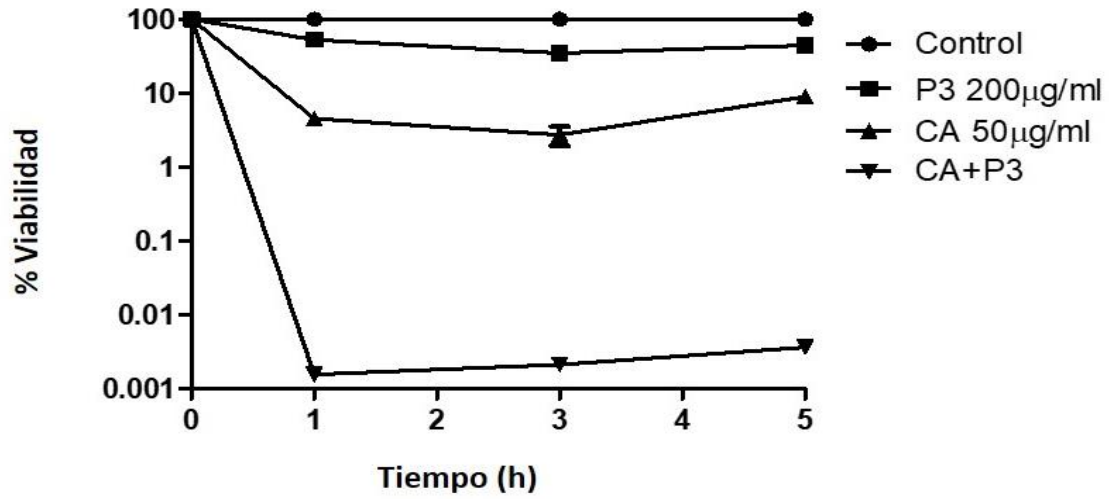


Figura 4.16. Porcentaje de células viables de *C. albicans* SC5314 tratadas con CA, P3 y una combinación de ambos agentes a diferentes tiempos de exposición: A) 1 h, B) 3 h y C) 5 h. Se incluye un control para cada tiempo (barra en negro).

Es interesante resaltar que el número de levaduras viables se fue recuperando ligeramente a las 3 y 5 h respecto al tratamiento a 1 h, aunque la viabilidad de la mezcla no experimentó un incremento notable con el paso del tiempo. Esta recuperación, que a priori puede parecer un poco sorprendente, podría estar relacionada y explicar las discrepancias entre los valores de MIC obtenidos (recordar que el protocolo para esta determinación fue de 24 h) y las concentraciones necesarias para determinar acción antifúngica observados tras 1 h de tratamiento.

Para un estudio más detallado de este comportamiento, la Figura 4.17 muestra la cinética de viabilidad en función del tiempo (Figura 4.17A), así como el ensayo de formación de colonias en medio YPD (Figura 4.17B). Con este método de estudio se observó el mismo comportamiento para la acción conjunta: un aumento espectacular de la efectividad antifúngica en las muestras expuestas a la combinación de los dos componentes, muy superior a la simple adición de efectos de ambos por separado. La Figura 4.17 ofrece también una representación más nítida de la disminución de viabilidad inducida por la combinación CA+P3. Por otra parte, respecto a la influencia del tiempo de exposición, el efecto antifúngico se mitiga ligeramente, y se produce una tenue pero progresiva recuperación del crecimiento. Es verosímil que las escasas células de *Candida* que no han muerto por la acción de CA+P3, comiencen a dividirse por gemación tras el efecto fungicida inicial. El posible metabolismo celular y presumible eliminación tanto del CA como de los componentes activos del propóleo podría cooperar a esta recuperación. El hecho de que pervivan unas pocas células que den lugar al crecimiento posterior es difícil de justificar con los datos actuales, aunque puede ser debido bien a que las dosis empleadas no sean suficiente para la eliminación por completo, o bien a que exista una fracción celular que posea resistencia intrínseca (células persistentes) (186). En cualquier caso, serán necesarios estudios más profundos para poder formular una teoría más precisa que explique este comportamiento.

A



B

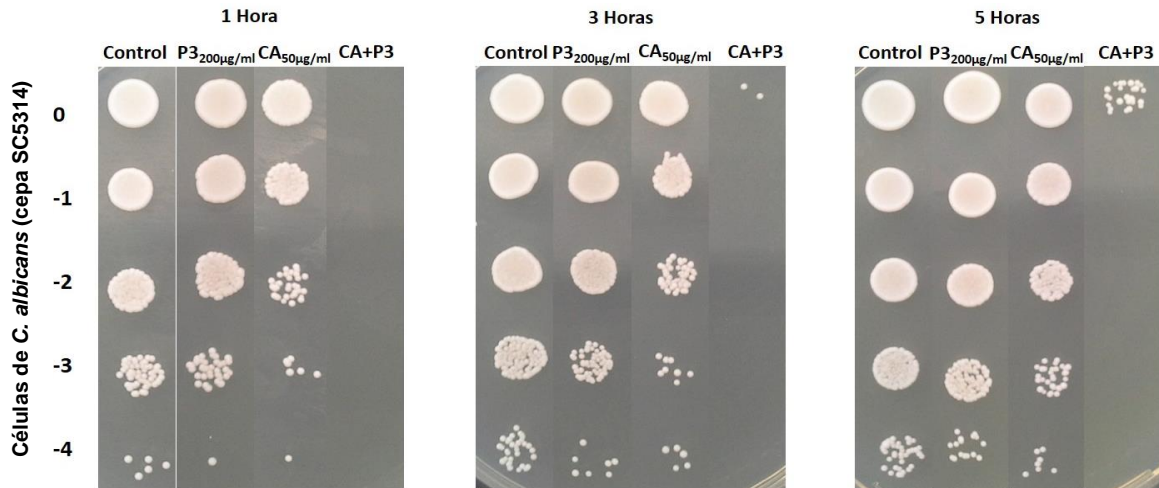


Figura 4.17. A) Gráfica que recoge la cinética de viabilidad celular sobre *C. albicans* (SC5314) mostrada en la Figura 3.18. B) Ensayo de formación de colonias macroscópicas en medio YPD sólido con las alícuotas del ensayo previo.

Cepa 015

Para confirmar el importante hallazgo acerca del efecto conjunto de ambos agentes y si dicha acción es general o específica sobre SC5314, se repitieron experimentos con la cepa 015. Hay que tener en cuenta la vocación industrial de la presente Tesis Doctoral, cuyo principal objetivo es la búsqueda de nuevos tratamientos con aplicación terapéutica. Por ello, se abordaron experimentos paralelos en la cepa 015 de *C. albicans*. La naturaleza de aislado clínico de esta cepa permite que los resultados sean más cercanos a la realidad de las infecciones humanas y proporciona una información con mayor aplicabilidad comercial sobre cepas diana más similares a las presentes en infecciones humanas.

Se utilizaron las mismas concentraciones de CA y P3 que en la cepa SC5314, manteniendo la relación CA:P3 (1:4), aunque en este caso no se realizó un estudio cinético y el tiempo de exposición a los agentes antifúngicos fue sólo de 1 h. Los resultados se muestran en la Figura 4.18, donde para facilitar la comparación, se muestra el resultado obtenido con las dos cepas, SC5314 y 015.

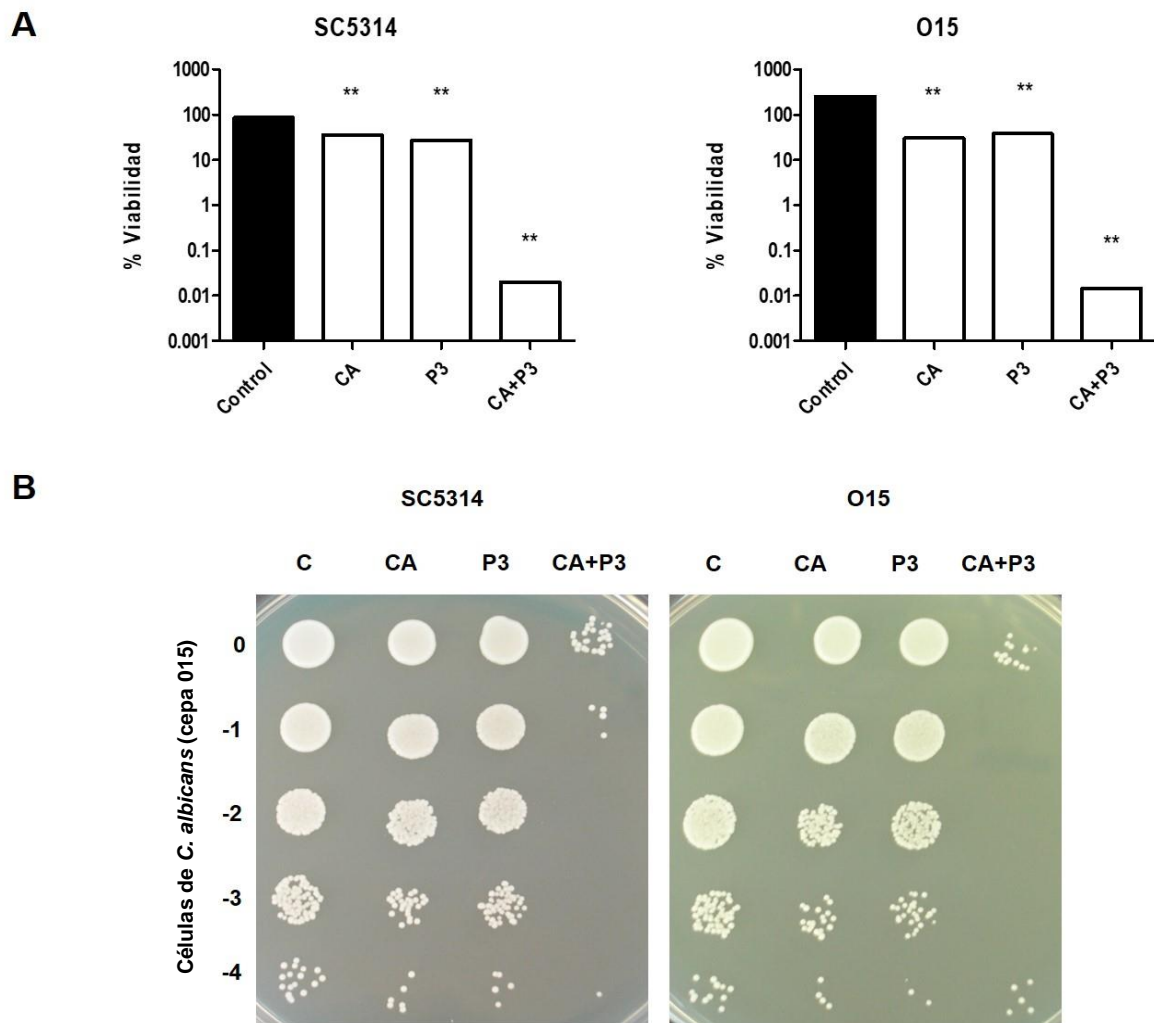


Figura 4.18. Sensibilidad de cultivos de las dos cepas de *C. albicans* (SC5314 y O15) frente a la combinación de CA+P3. Se mezclaron 50 $\mu\text{g/ml}$ de CA y 200 $\mu\text{g/ml}$ de P3. A) Viabilidad expresada en tanto por ciento. B) Formación de colonias macroscópicas con las mismas alícuotas mostradas en A).

En primer lugar, los resultados indican que el efecto potenciador de la combinación de ambos extractos fue también manifiesto en la cepa O15. En términos generales, la correlación entre los ensayos de viabilidad y de “spots” es bastante aceptable para ambas cepas, salvo en el caso de la dilución 10^4 (-4 en la escala izquierda de la Figura 4.18B) para la muestra de acción conjunta de ambos extractos, pero muy probablemente este comportamiento extraño se puede deber a un error en la dilución de este punto de la serie, ya que las diluciones 10^2 y 10^3 indican una viabilidad nula.

Por encima de los pequeños errores o desviaciones, la conclusión preliminar más relevante es que la combinación de ambos extractos multiplica el efecto antifúngico, de modo que la acción conjunta es muy superior a la mera adición de los efectos antifúngicos de CA y P3 por separado. Además, el efecto sinérgico se observa sobre las dos cepas de *C. albicans* con muy leves diferencias. Este comportamiento es indicativo de un sinergismo entre ambos productos naturales.

➤ **Cálculo de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (MICs) de P3 y CA combinados**

Continuando con la investigación sobre la interacción entre ambos componentes, se calcularon las MICs resultantes de la combinación de CA y P3. Se siguió el mismo protocolo EUCAST utilizado para la determinación de las MICs de CA y P3 considerados por separado. Los valores determinados para las dos cepas de *C. albicans* se muestran en la Tabla 4.4.

Tabla 4.4. Concentraciones Mínimas Inhibitorias (MIC) de CA y P3 ($\mu\text{g/ml}$) determinadas a las 24 horas según el método EUCAST. Se calcularon las MIC₅₀ sobre ambas cepas de *C. albicans*: SC5314 y 015 y se incluyó un control de crecimiento (CC*).

| Compuesto | CC* | MIC ₅₀ |
|---------------|-----|-------------------|
| <i>SC5314</i> | | |
| CA:P3 | + | 31,25:125 |
| <i>015</i> | | |
| CA:P3 | + | 62,50:125 |

Al comparar estos resultados con los obtenidos para CA y P3 de forma aislada (Tabla 4.2), se observa como la disminución de la dosis de ambos compuestos en combinación simultánea es muy notable, y excede el efecto que se produciría por la simple suma de los

potenciales antifúngicos individuales. Por tanto, los datos de supervivencia celular y los valores de MIC apoyan la existencia de un **sinergismo**, al menos en relación con el patógeno *C. albicans*.

Isobogramas: evidencia matemática de la actividad sinérgica.

Para una mejor caracterización del efecto sinérgico se han desarrollado recientemente algoritmos matemáticos que analizan la diferencia entre acción subaditiva, meramente aditiva y sinérgica de dos compuestos con actividad antimicrobiana en relación con la acción aislada de cada uno de ellos (187). Estos análisis matemáticos proponen el uso de isobogramas para dilucidar claramente esta cuestión. La aplicación de este procedimiento a nuestros resultados (Figura 4.19) muestra inequívocamente que la combinación CA más P3 tiene un fuerte efecto sinérgico sobre la cepa SC5314 de *C. albicans*. La recta que une los valores de MIC de cada componente aislado (en color rojo) corresponde a zonas donde el efecto sería simplemente aditivo, mientras que toda el área triangular bajo dicha recta implica espacio de acción sinérgica. Por el contrario, la superficie fuera del triángulo formado por la recta y los ejes de coordenadas indicaría acciones subaditivas donde un agente atenuaría la acción del otro. Como se observa en la Figura 4.19, el isobograma confirma claramente el sinergismo entre CA y P3, para ambas MICs.

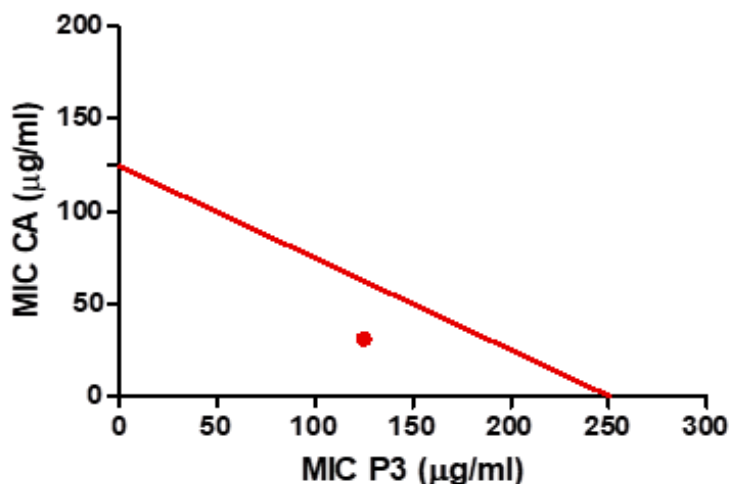


Figura 4.19. Representación isobolográfica de la combinación de CA y propóleo P3 sobre la cepa SC5314 de *C. albicans*. Para su construcción, se representan en los ejes las dos MICs calculadas para cada compuesto aislado y se unen mediante una recta, obteniéndose así el triángulo. A continuación, se representan los valores de la MIC resultante de la combinación de ambos compuestos obteniéndose un punto para cada mezcla. Si el punto queda dentro del triángulo obtenido al trazar la línea que une las MICs de los compuestos aislados, la acción de los compuestos es sinérgica, como se da en este caso.

4.2.4 Ampliación del estudio de la actividad antifúngica de P3 y CA combinados sobre otros hongos: *Cryptococcus neoformans*

El siguiente paso consistió en comprobar la eficacia de la mezcla CA+P3 sobre el otro patógeno objeto de interés en el presente trabajo: la cepa H99 de *C. neoformans*, tanto explorando su viabilidad en medio líquido como calculando las MICs correspondientes.

➤ Ensayos de viabilidad en medio líquido

En esta serie, se analizó la actividad antifúngica sobre *C. neoformans* utilizando un cultivo crecido en YPD en fase exponencial ($DO_{600} = 0,8-1,0$). Alícuotas conteniendo una densidad celular aprox. de 10^7 células/ml se expusieron a la mezcla CA+P3 a las concentraciones indicadas, tomando muestras a 1, 3 y 5 h. Se determinó tanto la viabilidad celular en medio líquido como el crecimiento colonial en medio sólido a cabo. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 4.20:

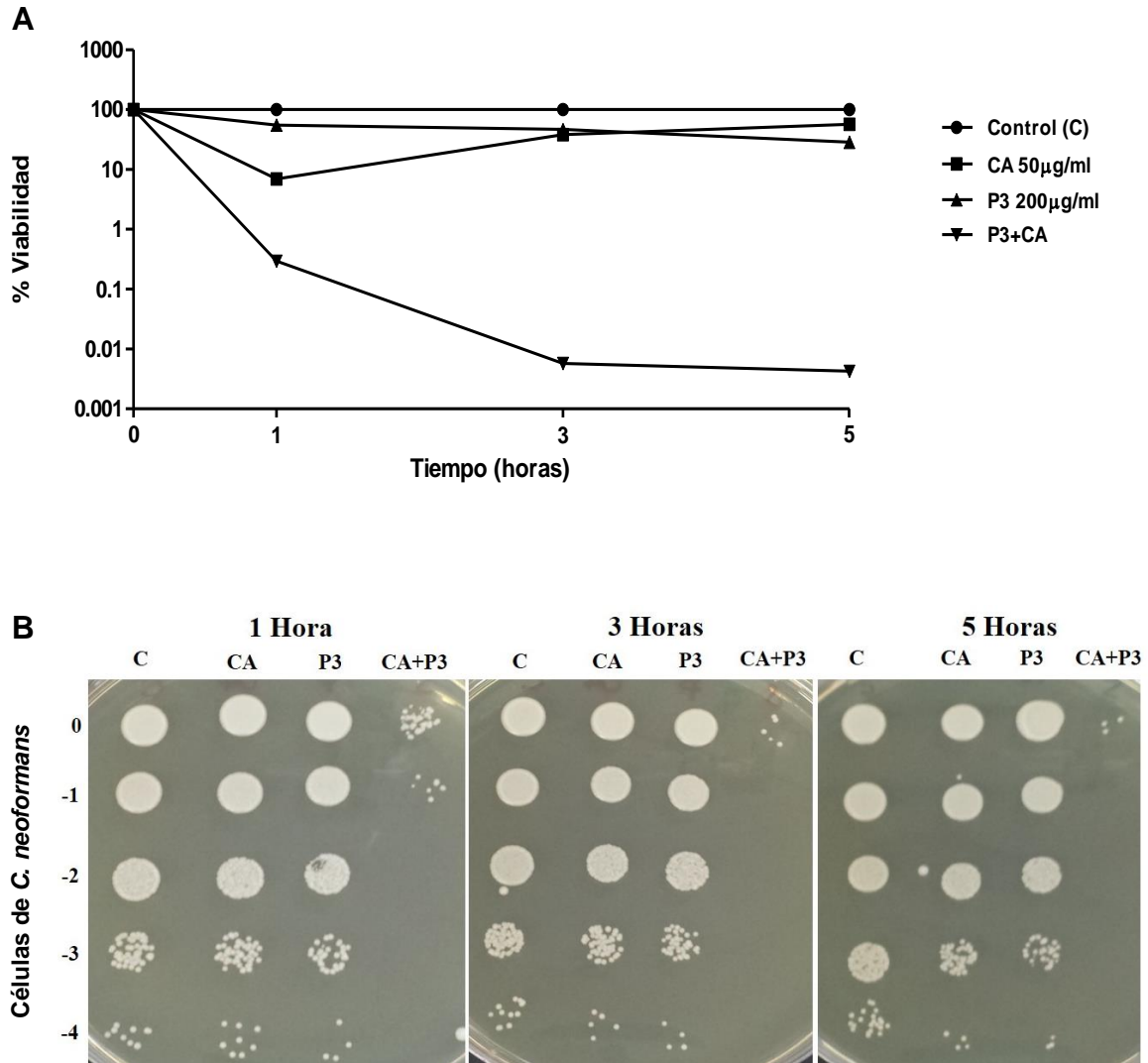


Figura 4.20. Cinética de sensibilidad antifúngica de *C. neoformans* utilizando los extractos de forma individual y en combinación a diferentes tiempos (1, 3 y 5h). Las concentraciones empleadas fueron las de referencia (CA: 50 µg/ml y P3: 200 µg/ml).

El efecto sinérgico CA+P3 también fue claramente observado sobre este basidiomiceto (Figura 4.20). No obstante, tal como se comentó anteriormente, con cada agente por separado este hongo es ligeramente más resistente que *C. albicans*, especialmente a tiempos cortos (1h).

Una diferencia notable entre ambos microorganismos es la cinética de muerte celular provocada por la mezcla CA+P3 a lo largo del tiempo. En el caso de *Candida*, entre la

primera y tercera hora se registraba el mínimo de supervivencia celular, prácticamente el 100% de mortalidad (Figura 4.17), con una cierta recuperación a las 5 h de la viabilidad, aunque progresiva y débil. Sin embargo, en *C. neoformans*, el perfil de acción temporal es distinto, mostrando una acción antifúngica más lenta, pero también más persistente. A 1 h *C. neoformans* es más resistente, pero a 5 h la viabilidad siguió disminuyendo (Figura 4.20) y no se observaron los indicios de recuperación que mostraba *C. albicans* SC5314 en la Figura 4.17.

También se ha completado el análisis morfológico en *C. neoformans* mediante microscopía óptica, aplicando el contraste de interferencia diferencial de Nomarski. Si bien se puede apreciar una ligera granularidad interna en las células tratadas con los compuestos individuales, las muestras sometidas a la combinación sinérgica presentan hinchazón junto con una granularidad rotundamente mayor (flechas rojas), así como alteraciones estructurales visibles en las células, que pueden interpretarse como cambios en la arquitectura externa (pared) que conducirían a la consiguiente muerte celular. Las imágenes de microscopía óptica se muestran en la Figura 4.21 y Figura 4.22.

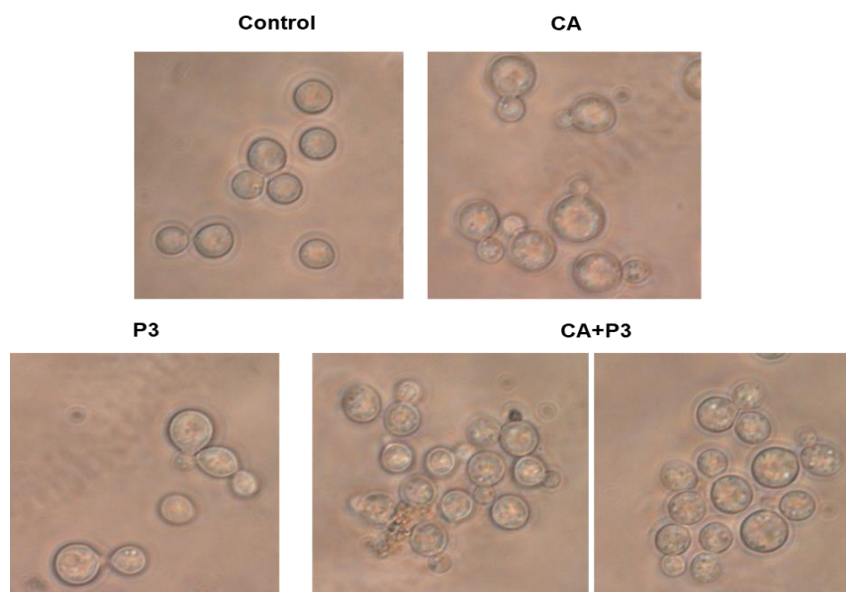


Figura 4.21. Fotografías de la morfología celular por mediante microscopía óptica de *Cryptococcus neoformans* H99, tras 1 h de tratamiento con P3 (200 µg/ml), CA (50 µg/ml) y la combinación de ambos. Se aplicó la técnica de contraste de interferencia diferencial de Nomarski.

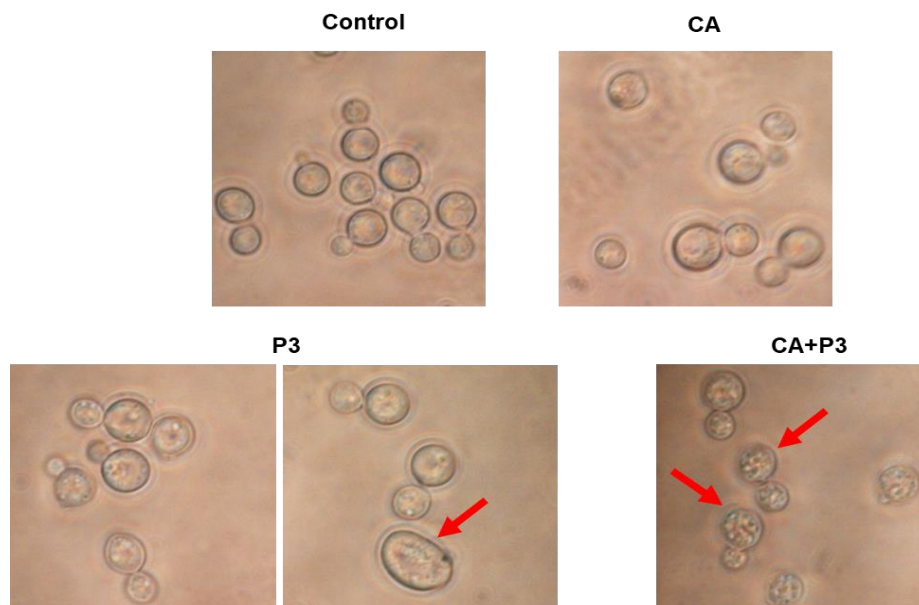


Figura 4.22. Fotografías tomadas tras 5 h desde la aplicación de los antifúngicos, en condiciones idénticas a la imagen anterior.

➤ **Cálculo de las Concentraciones Mínimas Inhibitorias (MICs) de P3 y CA combinados**

La Tabla 4.5 detalla la concentración mínima inhibitoria de *C. neoformans* en presencia de CA y P3. Teniendo en cuenta las MICs individuales para estos compuestos, se puede intuir una interacción sinérgica entre ambos, ratificando las observaciones realizadas hasta ahora con *C. albicans*. Cabe destacar que las lecturas de las MICs en *C. neoformans* se realizaron a las 48 h, pues este hongo posee un menor ritmo de crecimiento.

Tabla 4.5. MICs de *Cryptococcus neoformans* respecto a la combinación de CA y P3, determinada según el protocolo EUCAST a 48 horas. Se determinaron las MIC₅₀ y también se incluyó un control de crecimiento (CC*).

| Compuesto | CC* | MIC ₅₀ |
|------------|-----|-------------------|
| <i>H99</i> | | |
| CA:P3 | + | 15,62:31,25 |

Isobogramas: evidencia del sinergismo en *C. neoformans*

A partir de las MICs, se construyó el correspondiente isoblograma de forma análoga al de la Figura 4.19. También en *Cryptococcus neoformans* se confirma la existencia del sinergismo (Figura 4.23), si bien atendiendo a los datos de MIC₅₀ el resultado fue más ajustado, lo que sería esperable por tratarse de otra especie con una sensibilidad diferente.

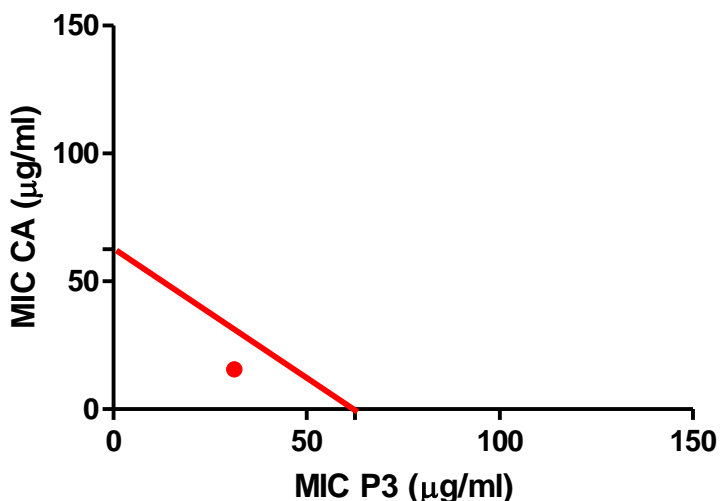


Figura 4.23. Isoblograma de la acción antifúngica de CA y P3 sobre *Cryptococcus neoformans* (H99) según modelo matemático de representación descrito en la Figura 4.19.

Por tanto, la existencia de una acción antifúngica sinérgica entre el ácido carnósico y el propóleo ha de ser un mecanismo general compartido por los distintos hongos patógenos analizados, donde el efecto aislado de cada compuesto se potencia en presencia del otro.

4.2.5 Estudios complementarios sobre otros hongos: efecto antifúngico en *Candida glabrata*

Actualmente y de forma creciente, están siendo identificados en brotes clínicos ciertos hongos tradicionalmente clasificados como saprófitos e inocuos (8,10). Estos patógenos suponen una amenaza para la salud a corto y medio plazo, ya sea por la disponibilidad

limitada de antifúngicos terapéuticos seguros y eficaces, como por su baja toxicidad selectiva y la aparición de resistencias (20). Entre ellos figura el grupo denominado coloquialmente *Candida* “non-albicans”, destacando *Candida glabrata*, una levadura haploide que no experimenta transición dimórfica. En pocos años *C. glabrata* ha incrementado notablemente su incidencia, poniendo en alerta la comunidad científica (12,16,20). Por ello, se decidió probar los compuestos sobre una cepa de laboratorio de *C. glabrata*.

La Figura 4.24 y la Figura 4.25 muestran, respectivamente, dos series cinéticas y sus correspondientes ensayos de formación de colonias macroscópicas en medio YPD sólido utilizando *C. glabrata*. En términos generales, CA y P3 aislados apenas afectan la viabilidad celular, pero su combinación induce el efecto sinérgico. No obstante, *C. glabrata* mostró una capacidad de supervivencia muy superior a la observada con los otros hongos estudiados. Al comparar con *C. albicans* a los mismos tiempos, *C. glabrata* es más resistente, tanto frente a la mezcla sinérgica como frente a los dos extractos considerados individualmente.

Por esta razón, se introdujo una nueva muestra donde manteniendo la relación 1:4, se duplicaron las concentraciones de ambos agentes (100 µg/ml de CA y 400 µg/ml de P3). Como resultado, la viabilidad disminuyó a niveles cercanos al 0,01% (Figura 4.24B), semejantes a los valores previamente obtenidos con los otros hongos. Desde el punto de vista cinético, esta levadura parece arrojar resultados a mitad de camino entre los dos microorganismos anteriores, ya que transcurridas 3 h de la exposición con los antifúngicos, la viabilidad se redujo ligeramente respecto a 1h y se produjo el mínimo de supervivencia, mientras a las 5h volvió a recuperarse el número de células, que llega a niveles similares a los de 1h (Figura 4.24A).

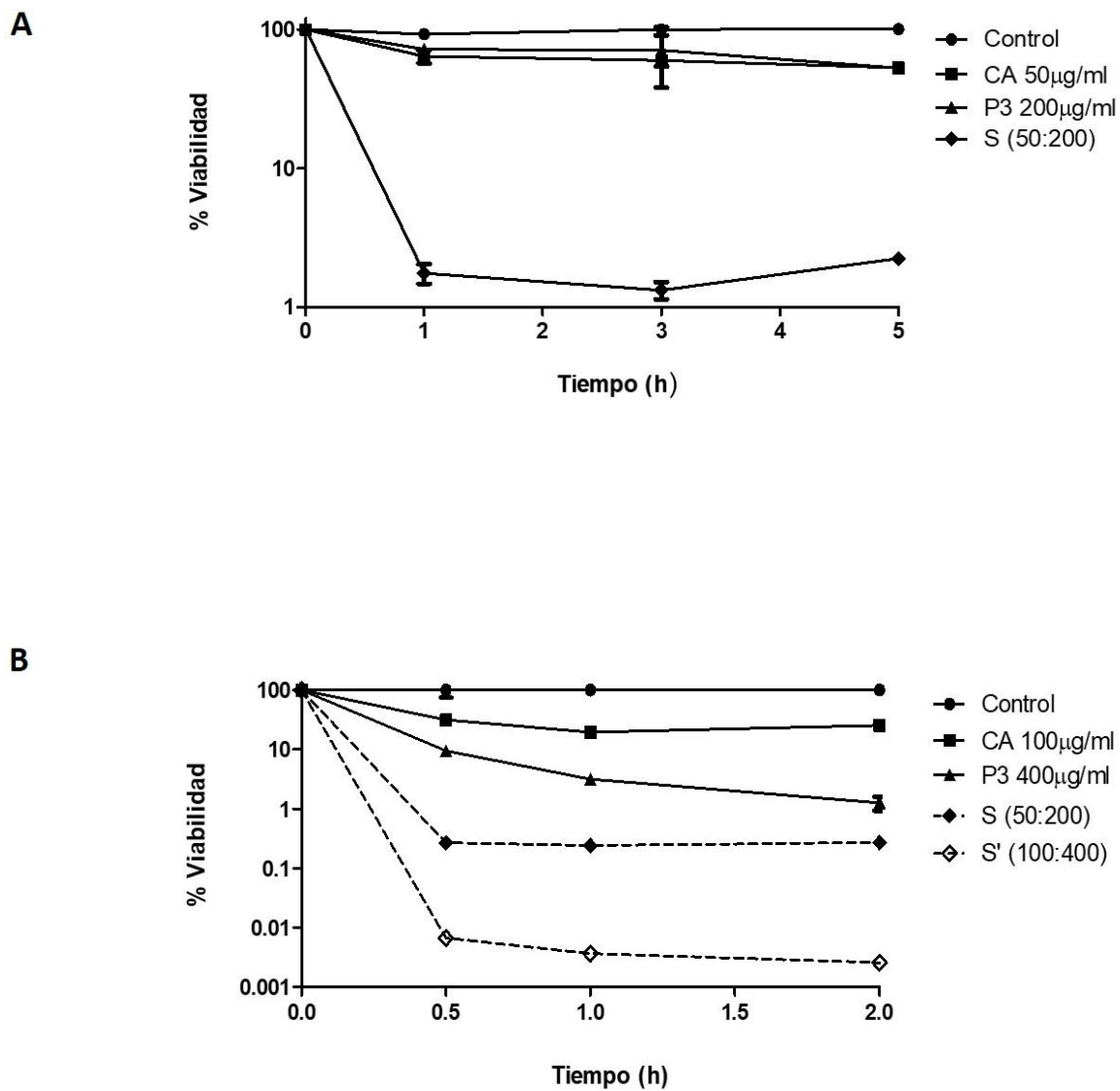


Figura 4.24. Experimento de viabilidad en medio líquido con *C. glabrata* (cepa ATCC 2001) tras añadir CA y P3 y dos combinaciones de ambos, S y S' (50:200 µg/ml y 100:400 µg/ml CA y P3, respectivamente). La serie S se siguió durante 5h (A), y la S' solo durante 2h (B).

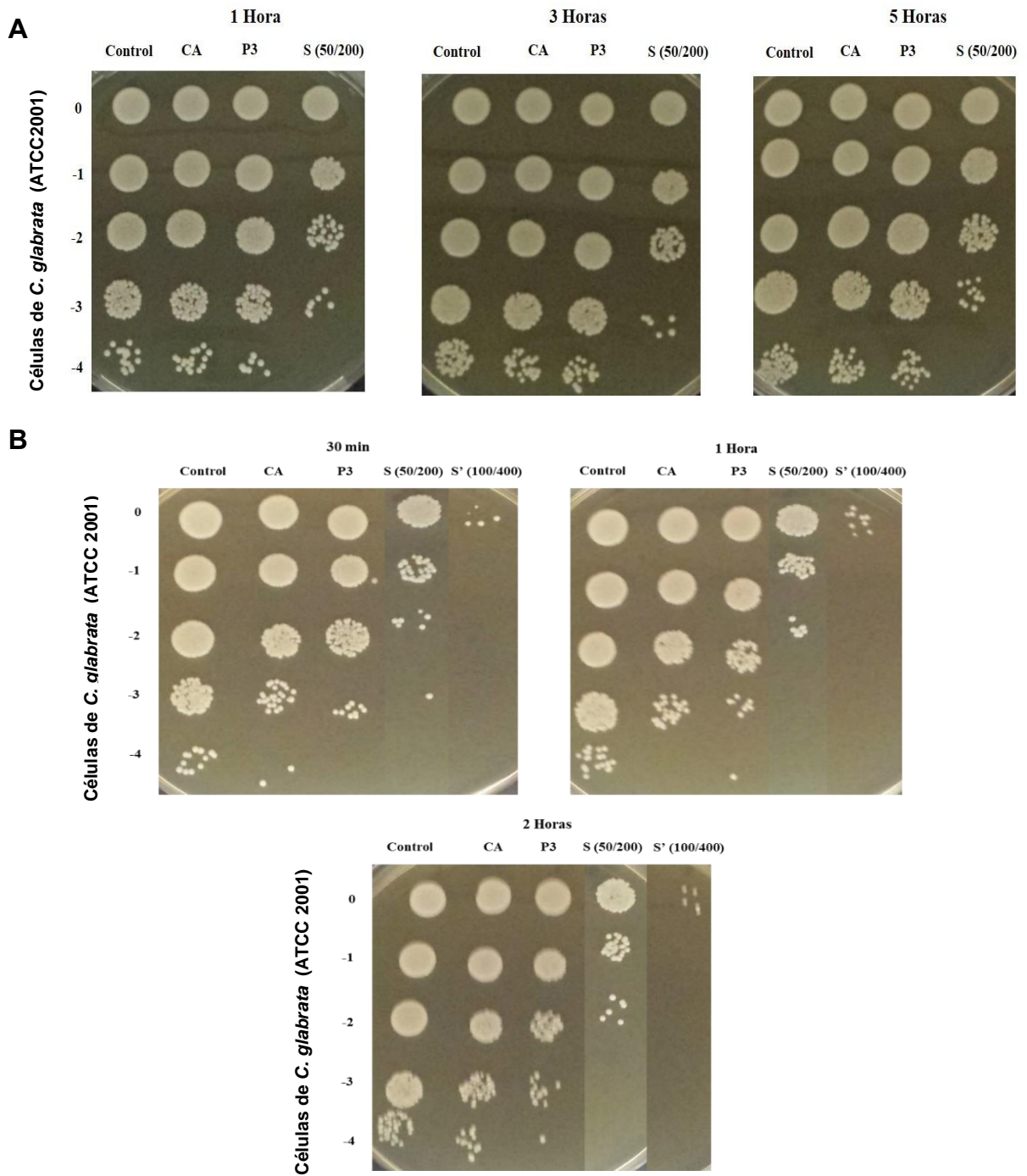


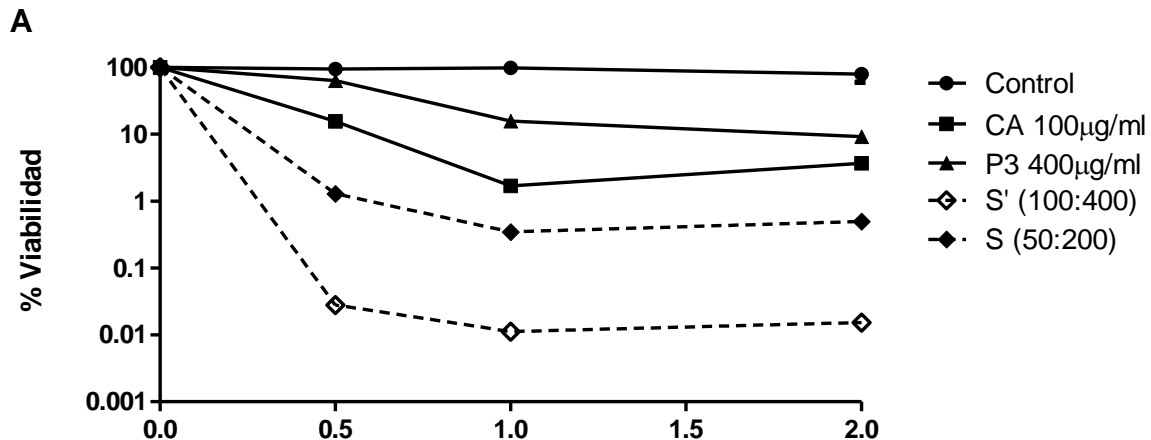
Figura 4.25. Ensayo de formación de colonias macroscópicas en medio YPD sólido, complementario a los recuentos de viabilidad celular en medio líquido (Figura 4.24). En ambos casos se utilizaron las mismas alícuotas y cepa de *C. glabrata* (ATCC 2001). La serie S se siguió durante 5h (A), y la S' solo durante 2h (B).

➤ **Acción sobre una cepa clínica de *C. glabrata***

Tras probar con una cepa de referencia, se experimentó también con una cepa procedente de un aislado clínico de *C. glabrata*.

Dado el carácter haploide y su menor tiempo de generación, se monitorizó la acción fungicida a tiempos cortos, donde se aprecian diferencias más grandes (ver Figura 4.24 y Figura 4.25). La justificación de esta decisión proviene de la observación microscópica de esta cepa, que mostró un volumen celular más pequeño, por lo que es mayor la superficie de contacto con los antifúngicos en el medio y por tanto más rápido el gradiente de transferencia, acelerando el proceso de destrucción celular; ello se traduciría en una pérdida de información fundamental durante ese lapso de tiempo. Por ello, se escogieron los intervalos de 0,5, 1 y 2 h, aprovechando para estudiar simultáneamente la influencia de las dosis (duplicación).

Los resultados se presentan en la Figura 4.26. En esencia, la cepa clínica de *C. glabrata* mostró un comportamiento muy similar a la cepa de referencia, manteniendo las tendencias y confirmando la necesidad de aumentar las concentraciones de CA y P3 para que la viabilidad quede aproximadamente en el 0,01% respecto al control (serie S'). En las 2h de seguimiento no se observa una recuperación del crecimiento significativa (Figura 4.26).



B

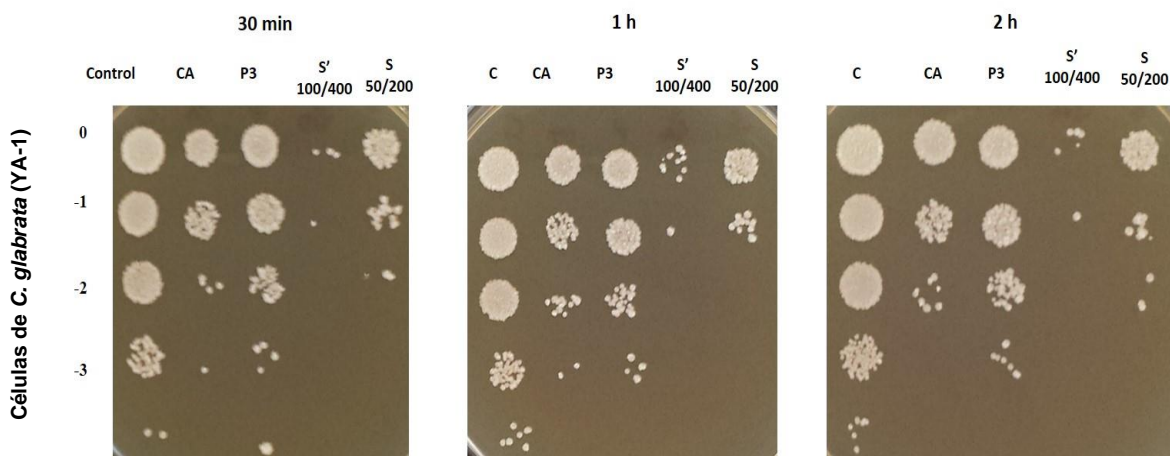


Figura 4.26. Resultados de viabilidad (A) y de formación de colonias macroscópicas en medio YPD sólido (B) con un aislado clínico de *C. glabrata* (YA-1) a diferentes tiempos de exposición con los compuestos CA y P3 de forma aislada y en combinación, a sus concentraciones de referencia (S) y duplicándolas (S'), 100 y 400 µg/ml respectivamente.

El análisis morfológico al microscopio óptico puso de manifiesto una notable granularidad periférica en la cepa de laboratorio (Figura 4.27), con una notable inclinación a la formación de agregados celulares en todos los casos, respecto al ensayo control. No fue apreciable la formación de estructuras miceliales, confirmando la ausencia de dimorfismo en *C. glabrata*. Las células presentaban deformaciones y ensanchamientos, principalmente en la región apical (Figura 4.28), sin que se pueda hablar estrictamente de micelios, aunque tal vez se podrían encuadrar como pseudohifas. La formación de agregados fue también muy evidente (Figura 4.28).

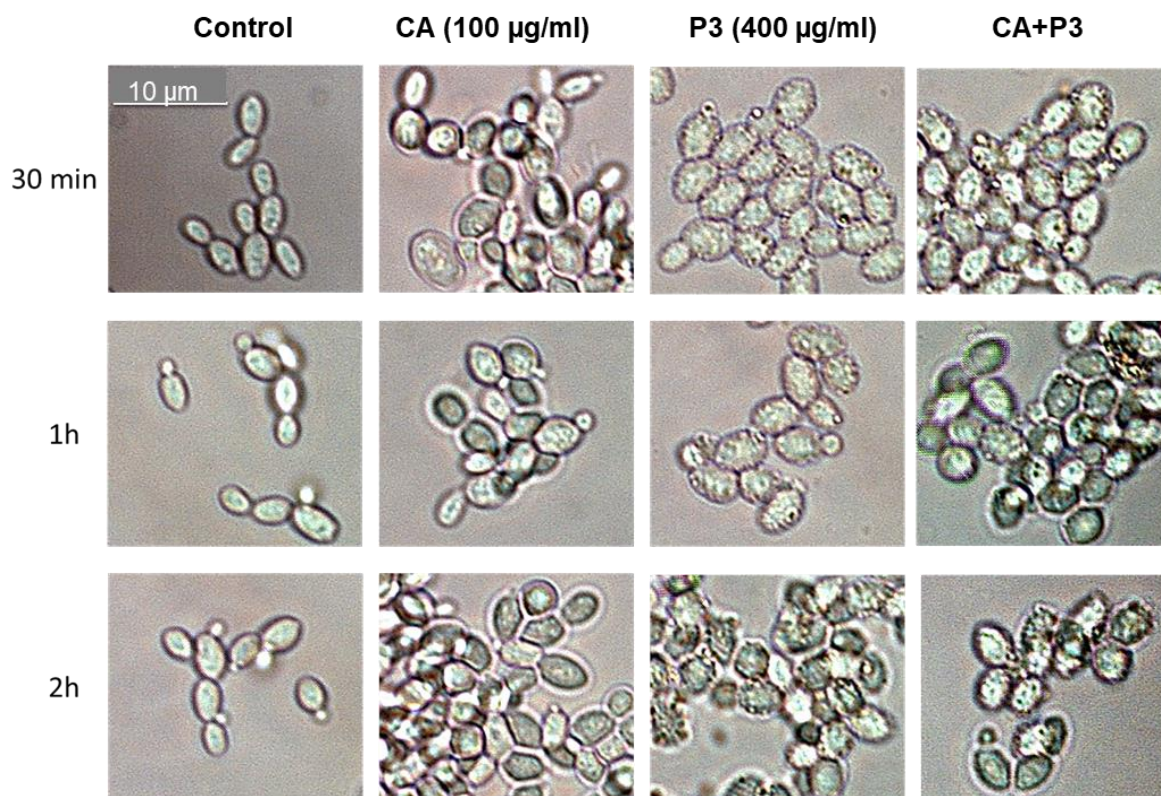


Figura 4.27. Inspección de la morfología celular mediante microscopía óptica, aplicando el contraste de interferencia diferencial de Nomarski sobre levaduras (blastoconidios) de *C. glabrata* (YA-1), tratadas con: P3 (400µg/ml), CA (100µg/ml) y la combinación de ambos compuestos. Se observó una mayor granularidad en las muestras tratadas con propóleo en relación con el control. La presencia de ácido carnósico sólo y su tratamiento combinado con propóleo, provocó, además, una mayor agregación celular.

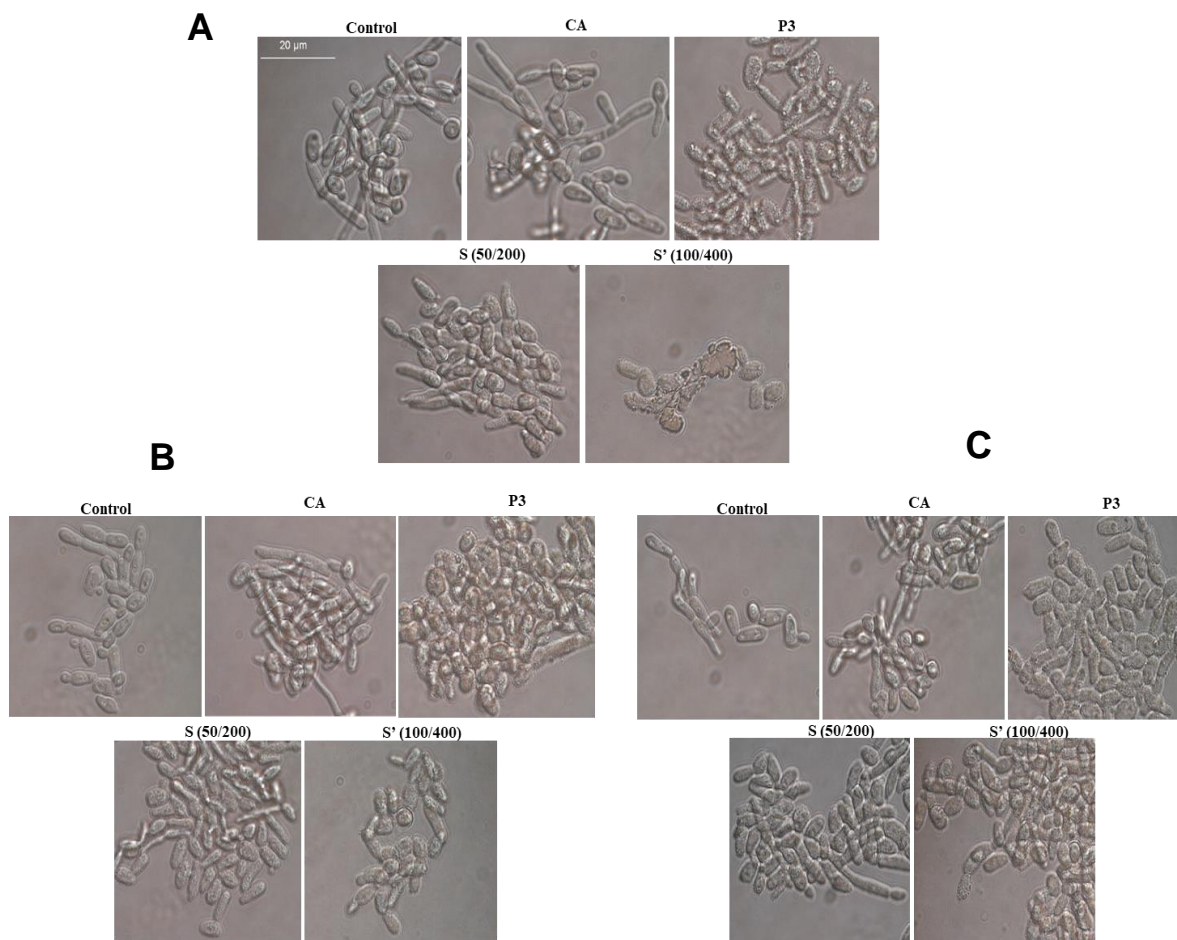


Figura 4.28. Morfología celular de *C. glabrata* (YA-1) al microscopio óptico, tras exposición con CA y PP durante 30 min (A), 1h (B) y 3h (C).

4.2.6 Breve estudio de otros productos comerciales con base de propóleo

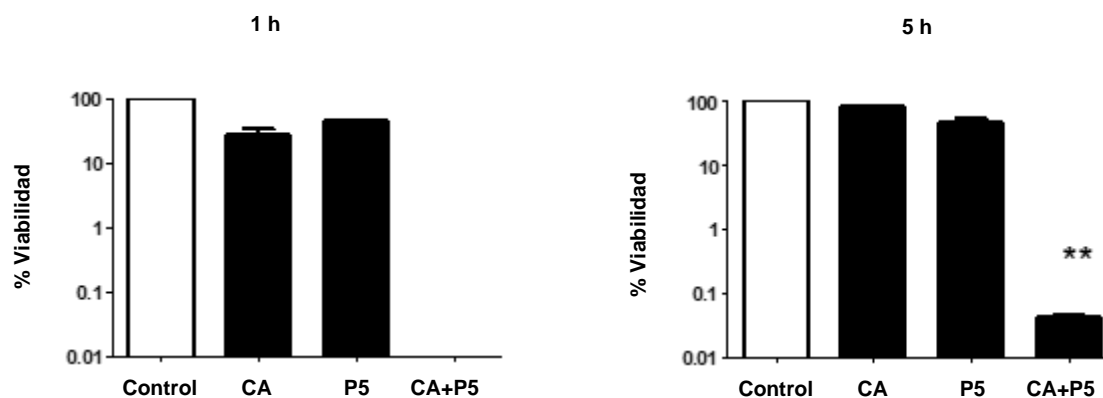
Como complemento a los experimentos anteriores y teniendo en cuenta el enfoque industrial del presente trabajo, se consideró conveniente complementar estos ensayos con estudios utilizando otros preparados de propóleo disponibles en el mercado, con la finalidad de conocer la capacidad antimicrobiana de potenciales competidores ya establecidos comercialmente.

Tintura de propóleo español

Este producto consiste en una tintura de propóleo comercial, originaria de España que parece poseer una capacidad antifúngica notable pero que no fue seleccionado para llevar a cabo el núcleo fundamental de la investigación, ya que, entre otros factores, se presenta como una tintura alcohólica y no un extracto sólido como las preparaciones asiáticas P3 y P2. Por tanto, no se puede asegurar que parte de los resultados obtenibles no fueran debidos únicamente al propóleo, sino también al disolvente o algún otro componente desconocido que acompañara al propóleo o al método de extracción o preparación de la tintura. En cualquier caso, y dada su actividad tan notable fue denominado P5, siendo utilizado en algunas secciones. Por ejemplo, para esclarecer la composición de la tintura P5 se llevó a cabo un análisis por HPLC (ver Apartado 4.3.1).

Para este primer estudio, se diseñó un experimento semejante a los anteriores, utilizando el P5 en la mezcla combinada con el CA, a las concentraciones más habituales (200 y 50 µg/ml, respectivamente). Los resultados se muestran en la Figura 4.29. Es obvio la existencia de una clara acción sinérgica también en este caso. Los efectos de este propóleo P5 a la concentración ensayada sobre la cepa SC5314 son más débiles, pero la capacidad antifúngica de la mezcla P5+CA es nuevamente sobresaliente.

A



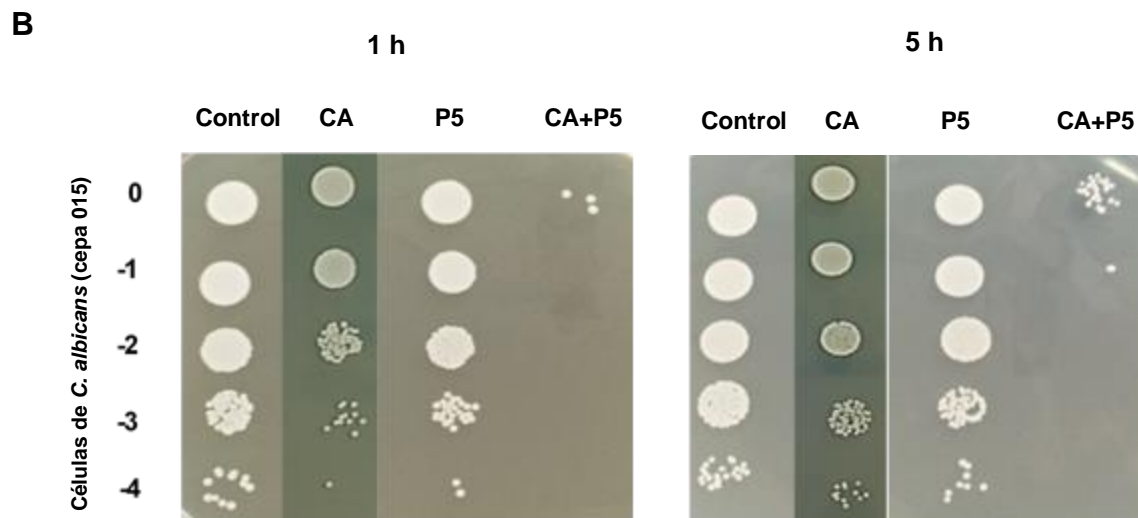


Figura 4.29. Efecto del propóleo P5 sobre la cepa SC5314 de *C. albicans* tras 1 y 5 horas de aplicación. A) Viabilidad tras tratamiento con CA y P5 a 50 y 200 µg/ml respectivamente, así como de la combinación de ambos. B) Formación de colonias macroscópicas en medio YPD sólido con las alícuotas anteriormente descritas.

4.2.7 Análisis sobre las implicaciones del sinergismo

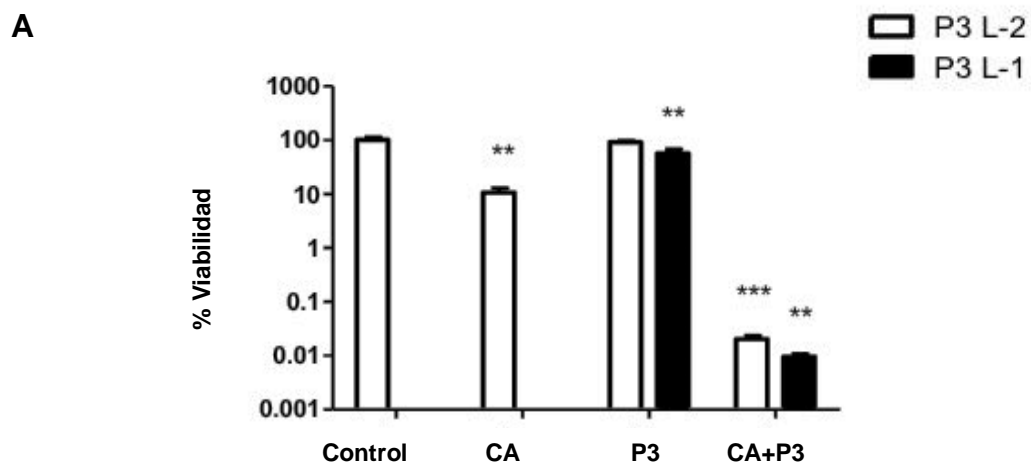
El concepto de sinergia significa que la interacción combinada de las partes crea un efecto mayor que la mera suma de ellas. En nuestra esfera de trabajo, se ha estudiado previamente el sinergismo entre el propóleo y algunos antibióticos, obteniéndose algunas conclusiones que sugieren que algunos antibióticos cuya eficacia había disminuido debido a la resistencia desarrollada por las bacterias, podrían volver a utilizarse, al menos durante las primeras etapas de la infección (96,102,155). Otro ejemplo de sinergismo es el resultante de la combinación de propóleo con miel frente a bacterias y levaduras, que además pone el foco de atención en la alteración de la membrana citoplasmática y la inhibición de las RNA polimerasas como principales dianas de acción del extracto (188).

La combinación de propóleo con muriprocin estimula la reducción celular de *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina (MRSA) y minimiza la respuesta inflamatoria del paciente (189). También actúa como un coadyuvante en el tratamiento de queratitis provocada por *Pseudomonas aeruginosa*, puesto que en este caso concreto se utiliza junto con los antibióticos tradicionales (154).

También se apreciaron efectos sinérgicos entre diferentes fracciones de extracto de romero en la capacidad antiproliferativa sobre células humanas de cáncer de colón (80), y se han investigado y detectado efectos sinérgicos de CA y trióxido de arsénico sobre la proliferación de la apoptosis en células humanas de leucemia mieloide (190), proponiendo que el CA podría ser un candidato en la terapia combinada para el tratamiento de este tipo de enfermedades mediante modulación de la señalización celular PTEN/Akt (190).

Adicionalmente, se exploraron las posibles diferencias entre dos lotes diferentes del mismo propóleo debido a la necesidad de garantizar su viabilidad comercial, ya que es fundamental conocer su disponibilidad en las condiciones y volumen necesarios. Además, era vital asegurar la trazabilidad del propóleo, ya que aun siendo suficiente su abundancia, si cada lote tuviera una composición y características muy diferentes, esta heterogeneidad podría constituir una barrera infranqueable que hiciera irreproducibles los resultados obtenidos y su posterior aplicabilidad.

A continuación, se muestran los ensayos utilizando la cepa 015 de dos lotes nuevos del propóleo P3 elegido, adquiridos en fechas diferentes. Los resultados son muy similares a los obtenidos previamente (Figura 4.30), si bien se observan ligeras variaciones, tan leves que resultó estadísticamente imposible discernir si eran intrínsecas a la propia metodología o bien a la variabilidad de los lotes de la materia prima:



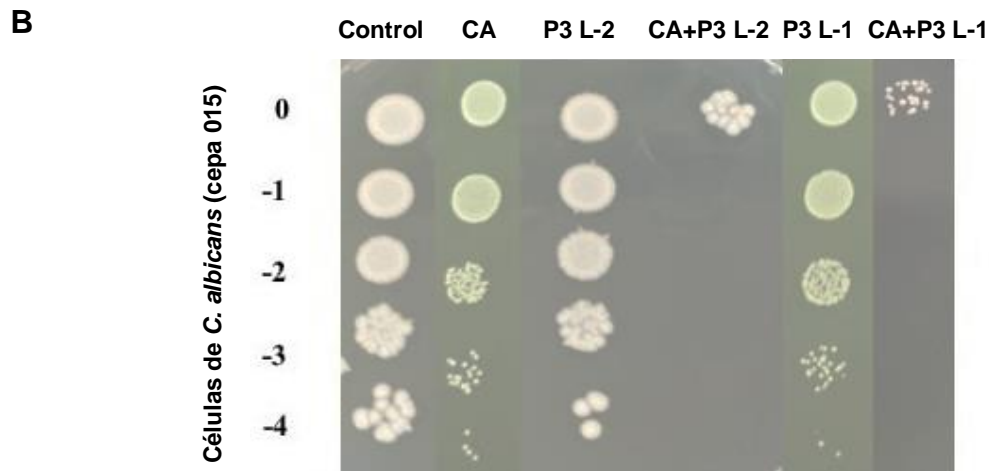


Figura 4.30. Experimento comparativo de dos nuevos lotes diferentes de propóleo P3 sobre *C. albicans* (015). A) Viabilidad (%) de dos nuevos extractos P3, distintos al empleado previamente, suministrados tanto individualmente como en combinación con el CA. B) Ensayo de formación de colonias macroscópicas en medio YPD sólido utilizando las alícuotas correspondientes a la Figura A).

Para estudiar la evolución del comportamiento de los antifúngicos, se llevó a cabo un ensayo a tiempos más largos de lo habitual, 1, 10 y 24 horas. Además, transcurridas 10 horas de la adición de dichos compuestos al cultivo, se volvió a añadir la misma concentración de P3 y CA, para comprobar si se producía una nueva bajada de la viabilidad o bien las células no se veían afectadas. Como puede apreciarse en la Figura 4.31, tras una hora de contacto del hongo con los compuestos, la viabilidad cae ligeramente en el caso del P3, algo más notable para el CA y abruptamente para la combinación de ambos compuestos. Con el paso del tiempo, se produce una paulatina recuperación, pero tras agregar de nuevo la combinación de los antifúngicos a las 10 horas (S+10), la viabilidad vuelve a caer, (probablemente de forma drástica a las 11 horas y luego fue aumentando progresivamente, pero no se recogió muestra). También cabe destacar que a las 10 horas el P3 parece ser un poco más eficaz que el CA, al contrario de lo que sucedía a 1 hora. Este fenómeno podría estar relacionado con las discrepancias entre las MICs obtenidas y algunas conclusiones desprendidas de los ensayos de viabilidad, ya que las MICs se calculan pasadas 24 h y la viabilidad tras 1h.

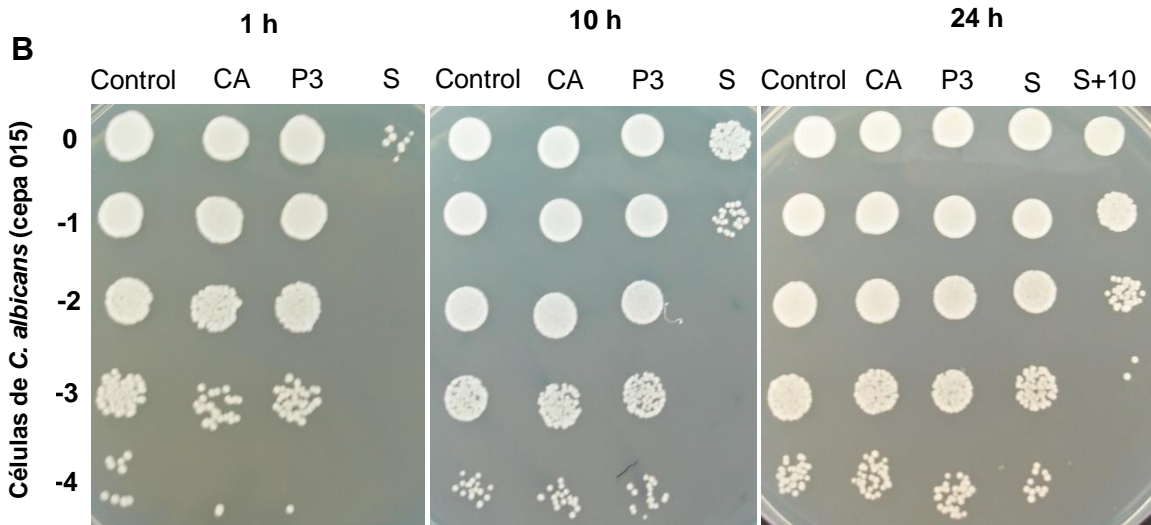
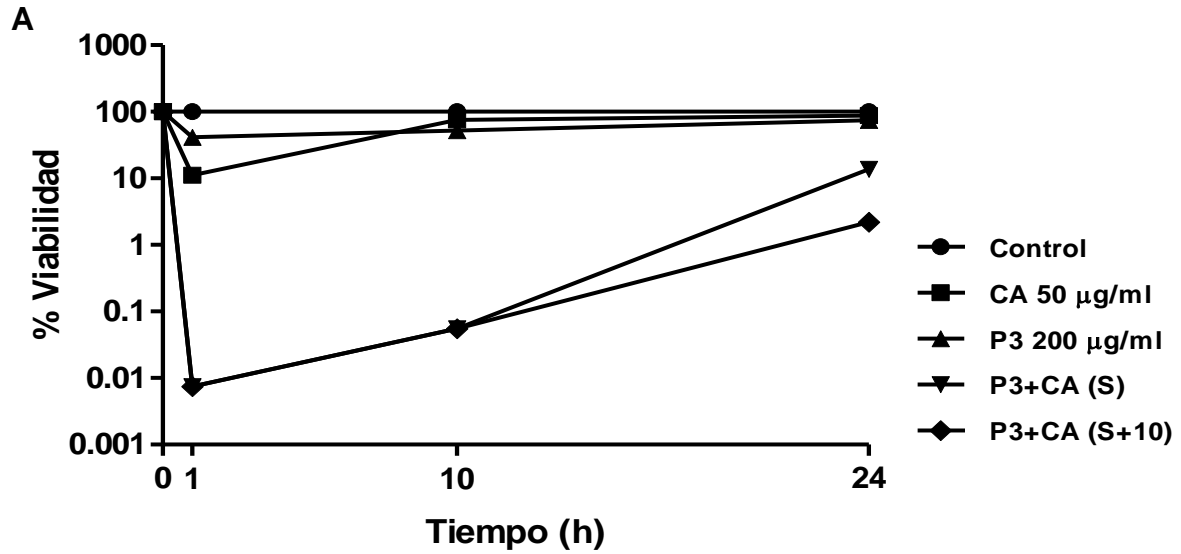


Figura 4.31. A) Cinética de actividad antifúngica de los compuestos CA (50µg/ml), P3 (200µg/ml) y una mezcla de ambos (S), frente a *C. albicans* (cepa 015) a distintos tiempos (1h, 10h y 24h). La muestra denominada (S+10), corresponde a una alícuota de las células tratadas con ambos compuestos, que a las 10 horas se les volvió a aplicar la misma dosis de CA y P3. B) Imagen del ensayo de formación de colonias macroscópicas en medio YPD sólido, empleando las mismas alícuotas de la Figura A.

4.2.8 Formulación de posibles mecanismos sinérgicos de los compuestos identificados en P3 y CA.

La combinación de diferentes antifúngicos es una estrategia que se viene explorando ampliamente en diferentes ámbitos (191–193). Por ello, se investigaron posibles combinaciones del sinergismo CA+ P3 (S) con otros antifúngicos ampliamente utilizados en la actualidad como la Anfotericina B (AmB). Como puede observarse en la Figura 4.32, la interacción entre dicha combinación produce un efecto aditivo ya que ambas sustancias ven potenciada su actividad frente a *Candida*.

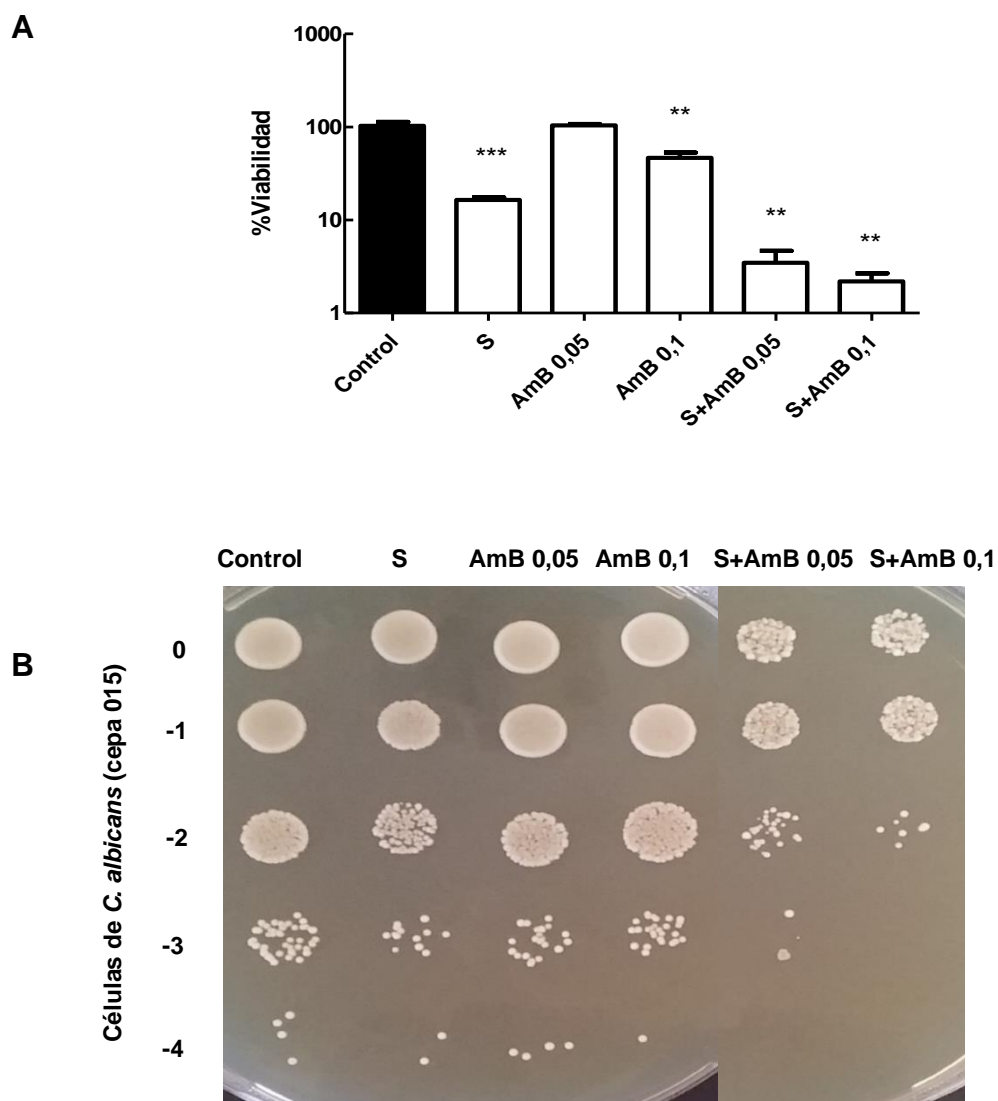


Figura 4.32. Estudio de la combinación de CA+P3 (S) a una concentración fija de 25 y 100 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente, con AmB utilizada en dos concentraciones: 0,05 y 0,1 $\mu\text{g/ml}$ sobre *C. albicans* (015). A) Viabilidad (%). B) Ensayo de formación de colonias macroscópicas en medio YPD.

4.3 ANÁLISIS DE LA COMPOSICIÓN DEL PROPÓLEO E INVESTIGACIÓN DE SUS POSIBLES COMPUESTOS ACTIVOS

Una vez comprobada que la mezcla CA+P3 muestra una poderosa actividad antifúngica, y teniendo en cuenta la heterogeneidad y complejidad de la composición del propóleo, se consideró interesante desde el punto de vista científico intentar caracterizar este componente. Además, dicha caracterización supondría un valor añadido no sólo por el conocimiento generado sino también porque facilitaría una posible comercialización de una preparación antifúngica, teniendo en cuenta que uno de los principales problemas a la hora trabajar con el propóleo es precisamente su estandarización.

Así pues, para abordar este capítulo analítico se diseñó la siguiente metodología de trabajo:

1. Análisis mediante HPLC del principal propóleo objeto de estudio (P3), y también los otros propóleos utilizados, como el P2 (resultados no mostrados) y P5, con fines comparativos.
2. Fraccionamiento del P3 mediante columna de extracción en fase sólida (SPE) teniendo en cuenta los datos obtenidos previamente en el cromatograma de P3.
3. Nuevos análisis por HPLC de las fracciones del P3 obtenidas en el paso anterior para posible subfraccionamiento.
4. Ensayo de actividad antifúngica con las distintas fracciones y subfracciones obtenidas en el análisis de HPLC.
5. Análisis por LC/MS de las subfracciones de mayor actividad antifúngica para en último extremo identificar la naturaleza de las moléculas responsables de dicha actividad.

La idea fue dividir el extracto original en porciones más pequeñas de características hidrofóbicas crecientes y medir su actividad antifúngica para que una vez se haya separado el propóleo en fracciones de composición más simples, se utilice el análisis LC/MS para identificar las principales moléculas responsables del efecto antifúngico observado, tanto aislado como en su combinación con CA.

El otro extracto natural utilizado de forma rutinaria en la presente investigación es el CA, cuya composición es conocida y se detalla en el Apartado 3.1.3. Mencionar brevemente que se trata de un extracto de romero con un contenido en diterpenos superior al 80% siendo el CA el diterpeno mayoritario con un 72% en la preparación que se ha usado de forma rutinaria. En algún caso puntual se utilizó un extracto de CA más puro (CA92, 92% de pureza. Ver Apartado 3.1.3).

4.3.1 Análisis cromatográfico de los propóleos utilizados

Tras la puesta a punto de las condiciones adecuadas de cromatografía para realizar los análisis de HPLC que se encuentran descritas en el Apartado 3.2.10, se llevó a cabo el análisis cromatográfico de P3 cuyos resultados se recogen en la Figura 4.33. Se muestra el perfil de absorción del eluyente a dos longitudes de onda, 280 y 340 nm, que son las que permiten un buen seguimiento de polifenoles y flavonoides:

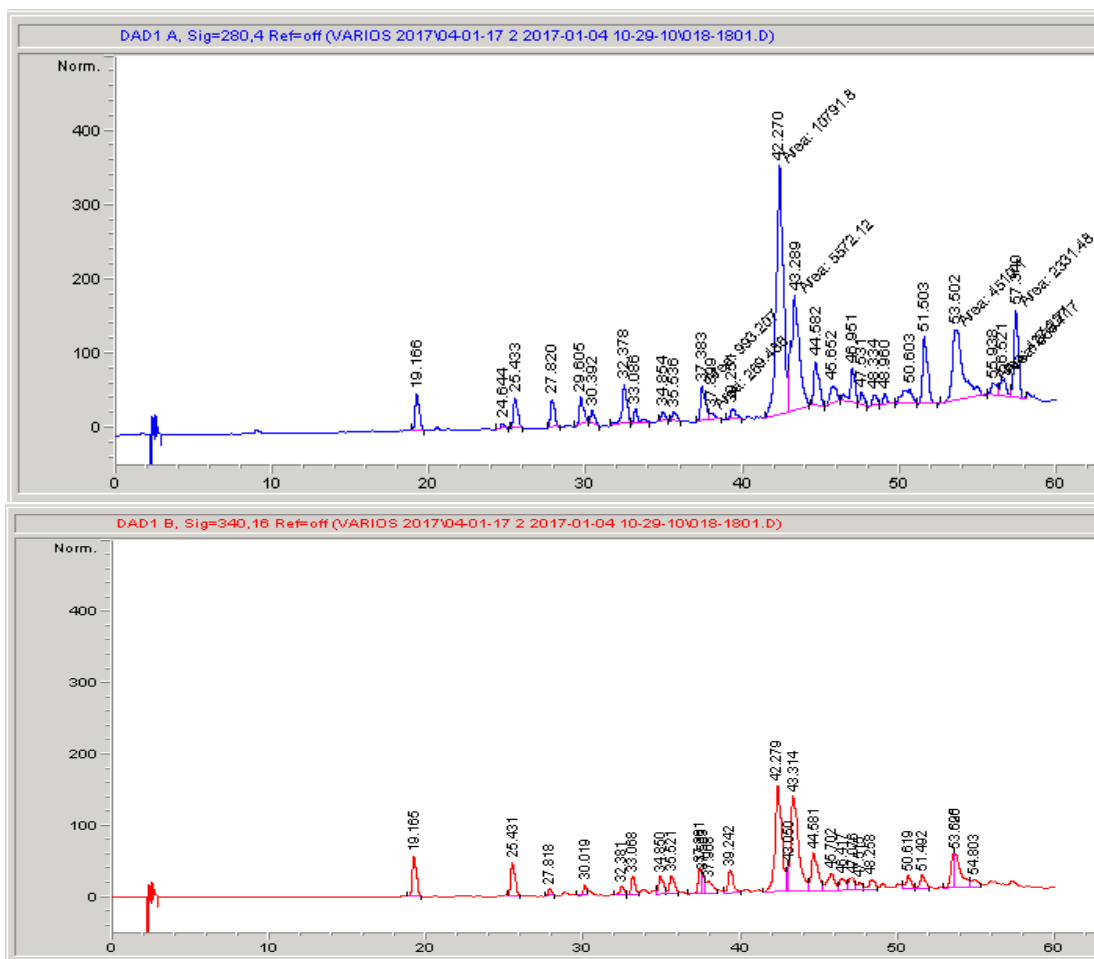


Figura 4.33. Cromatogramas del extracto de propóleo P3 mediante detección de la absorbancia del eluido a las longitudes de onda de 280 y 340 nm, respectivamente.

Como puede apreciarse, la elución de los componentes con absorción en la región UV comienza a ser significativa a partir de los 20-25 minutos y no es hasta después de rebasar los 40 minutos cuando eluyen los picos con mayor área y por tanto los más abundantes. Este periodo de la cromatografía coincide con una disminución de la polaridad de la fase móvil, que se va enriqueciendo en el contenido de acetonitrilo. Este patrón de elución en principio indica que los compuestos más abundantes tienen una polaridad relativamente baja (194).

El perfil cromatográfico mediante HPLC de P2 fue muy similar (no mostrado). Poseía el mismo origen geográfico (China), menos actividad que P3 y no contenía ningún pico con diferencias significativas, por lo que se continuó el estudio solo con P3.

También se llevó a cabo el análisis por HPLC de P5. Esta tintura mostró un potencial antifúngico destacado pero una procedencia radicalmente distinta (España). Por ello, los datos podían ser complementarios para intentar aportar alguna información relevante a la hora de identificar compuestos responsables de la actividad *anticandida* observada. El perfil cromatográfico de P5 se recoge en la Figura 4.34:

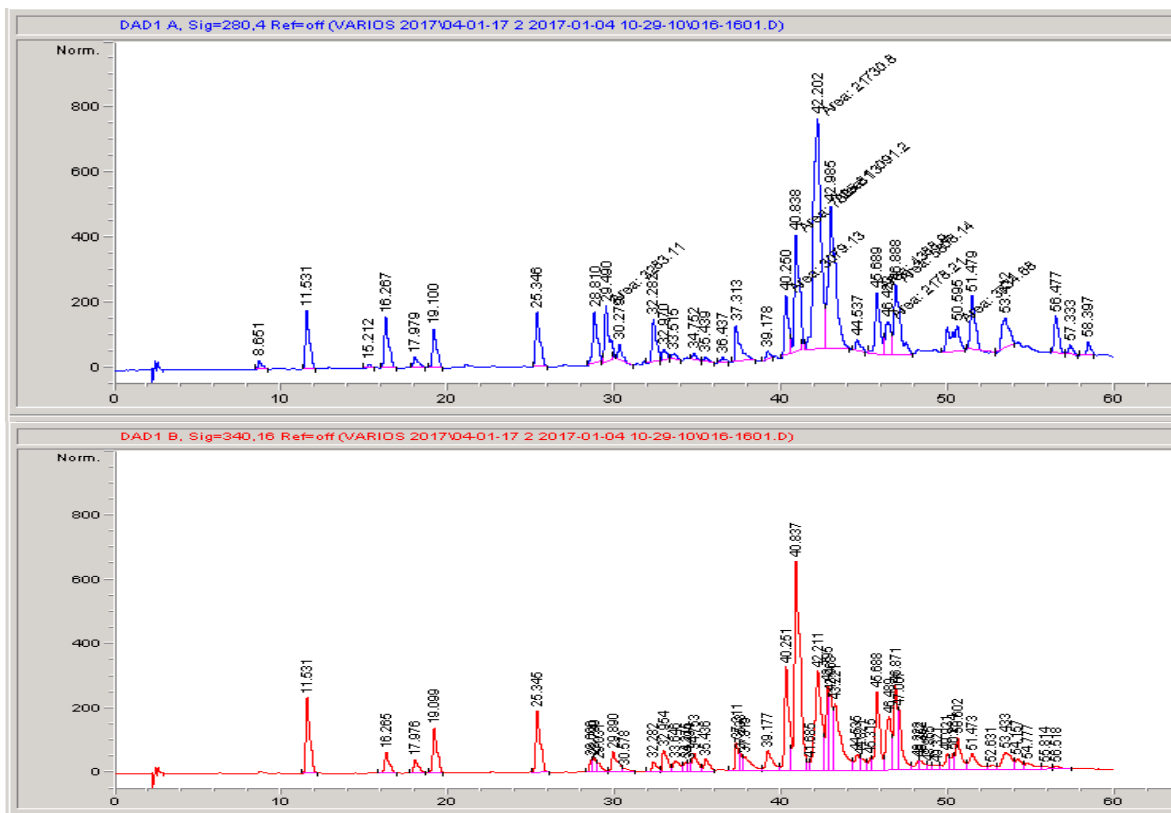


Figura 4.34. Cromatogramas del extracto de propóleo P5 a las longitudes de onda de 280 y 340 nm, respectivamente.

Los propóleos P3 y P5, al igual que P2 (no mostrado) presentaron perfiles cromatográficos bastante similares en términos cuantitativos. P5 contiene picos de mayor altura (observar escala de absorbancia, doble en cromatograma de P5 respecto a P3), sobre todo en el perfil cromatográfico seguido a 340 nm. Asimismo, los picos de P3 eran en general más altos que los de P2. Ello indica que las 3 preparaciones contienen aproximadamente los mismos compuestos, pero la concentración se ordena $P5 > P3 > P2$, lo que sería congruente con su grado de actividad antifúngica, tanto individualmente como en

combinación con CA. Siguiendo con el estudio comparativo, la mayor parte de los compuestos potencialmente activos parecen eluir en la franja 30-50 minutos en ambas longitudes de onda. Los componentes en dicho intervalo fueron seleccionados como objetivos prioritarios para ser estudiados con mayor detalle.

4.3.2 Fraccionamiento del propóleo P3 y ensayos de actividad

Tomando como referencia el gradiente de la fase móvil utilizado en el análisis por HPLC, se elaboró un método de fraccionamiento basado en polaridad decreciente empleando cartuchos con relleno hidrofóbico y como fases móviles para la elución mezclas hidroetanólicas de concentración creciente en este alcohol y por tanto de polaridad decreciente (para más detalles consultar el Apartado 3.2.8):

- 0% de etanol: H₂O
- 25% de etanol: EtOH25
- 50% de etanol: EtOH50
- 75% de etanol: EtOH75
- 100% de etanol: EtOH100

En principio, la separación entre las fracciones parecía bastante satisfactoria, pues los picos potencialmente interesantes, eluyen casi en su totalidad en la fase extraída con etanol al 75% (EtOH75, Figura 4.35D).

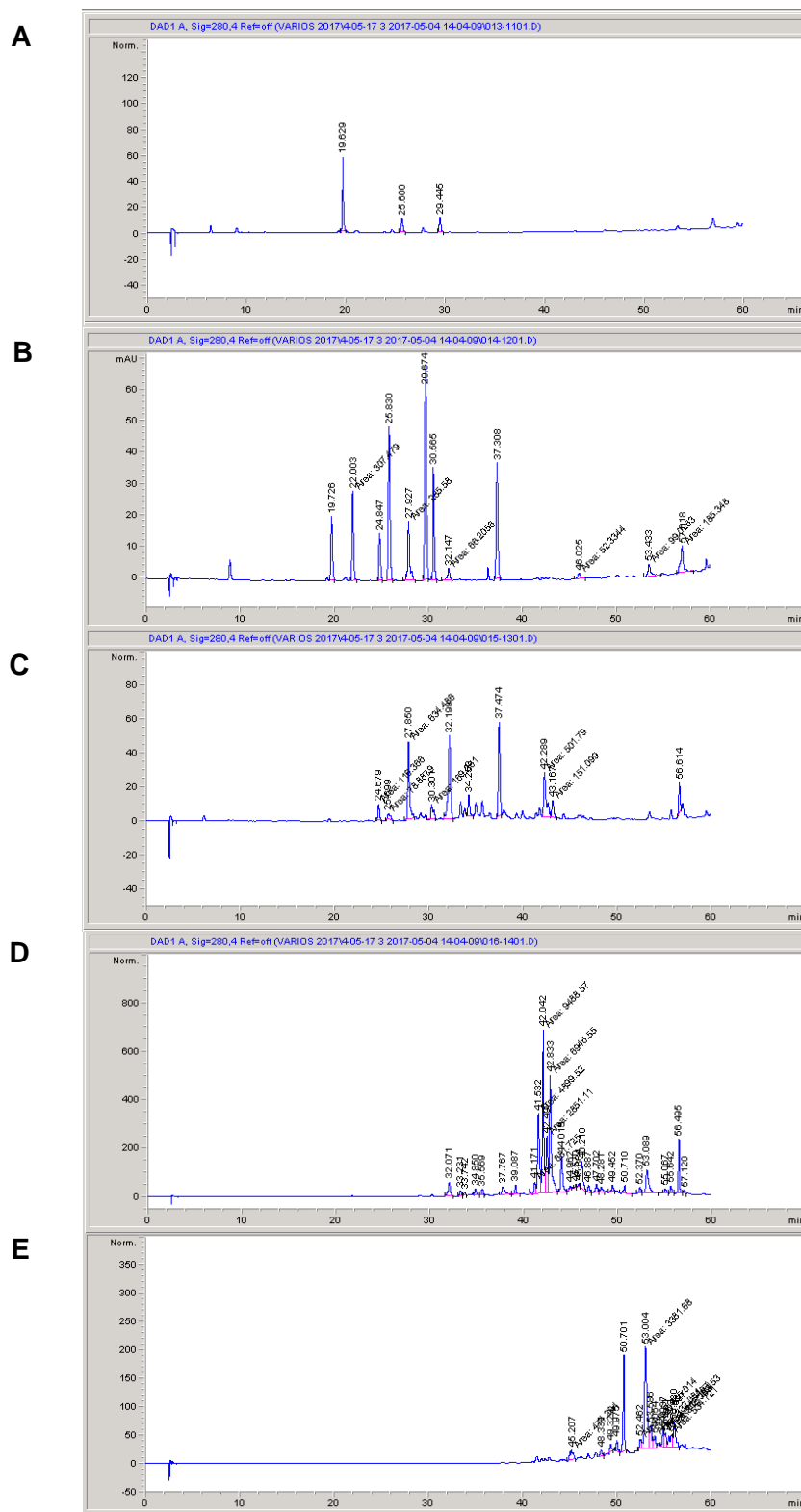


Figura 4.35. Cromatogramas correspondientes al fraccionamiento del propóleo P3. Las diferentes fracciones obtenidas son A) H₂O, B) EtOH25. C) EtOH50. D) EtOH75. E) EtOH100. El perfil de elución mostrado corresponde a la absorción a 280 nm.

A pesar de haber obtenido una buena separación del P3 (ver Figura 4.35), para confirmar la presencia de actividad antifúngica en cada fracción, se llevó a cabo el correspondiente ensayo microbiológico usando la cepa 015 de *C. albicans*. Las concentraciones de componentes de cada fracción debían de ser calculadas de modo indirecto, es decir, calculadas en base a los sólidos obtenidos empíricamente, de cada fracción tras el fraccionamiento, secado y pesado, de manera que se reprodujera fielmente el porcentaje real de cada fracción respecto al propóleo original. Por ejemplo, experimentalmente se obtuvo que los sólidos de la fracción EtOH75 suponían alrededor del 30% del total del P3, por lo que, si se tomaba una concentración de 500 µg/ml de P3, la de EtOH75 debía ser de 150 µg/ml, para así reproducir lo más fielmente posible la actividad antifúngica de cada fracción. Las concentraciones de cada fracción se muestran en la Tabla 4.6:

Tabla 4.6. Concentraciones (µg/ml) de los compuestos y fracciones utilizadas en los experimentos microbiológicos, cuyos resultados se muestran en la Figura 4.36. En el caso de las fracciones, sus concentraciones son proporcionales a su distribución dentro del P3, calculadas experimentalmente al realizar el fraccionamiento del P3.

| FRACCIONES | CONCENTRACIÓN (µg/ml) | PORCENTAJE DEL TOTAL EN P3 (%) |
|-------------------|----------------------------------|---|
| P3 | 500 | - |
| H ₂ O | 12,5 | 2,5 |
| EtOH25 | 1,8 | 0,4 |
| EtOH50 | 16 | 3,2 |
| EtOH75 | 150 | 30 |
| EtOH100 | 125 | 25 |

Como ya se ha comentado, las concentraciones presentes de cada fracción en el P3 son necesarias para correlacionarlas con la actividad antifúngica teniendo en cuenta el factor de dilución y reparto introducido como resultado del fraccionamiento. Es también importante aclarar que dichas fracciones no suman el 100%, lo que indica que una parte de la masa del P3 original o bien queda retenida en el cartucho SPE o bien se pierde en las extracciones sucesivas, o bien por su elevada volatilidad. En estas pérdidas se pueden

encontrar algunos aceites esenciales, que probablemente se han evaporado en el rotavapor durante el curso del procedimiento experimental.

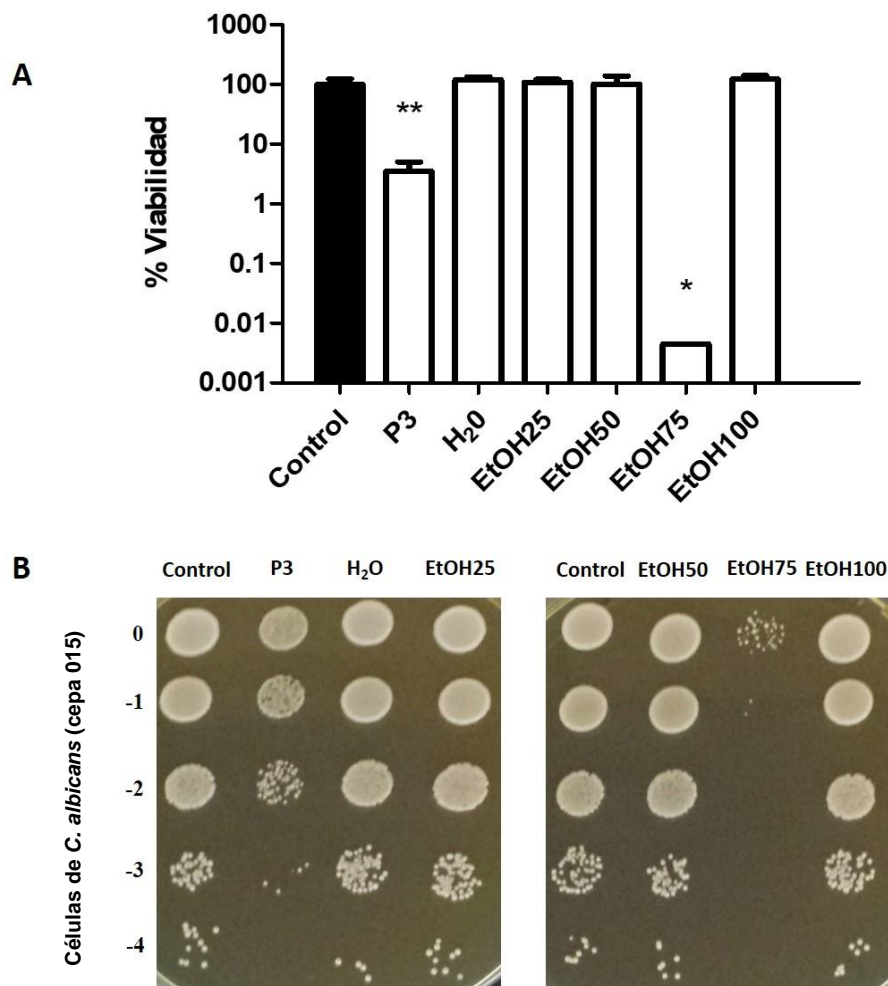


Figura 4.36. A) Ensayo de viabilidad en medio líquido con la cepa 015 de *C. albicans* utilizando como fuente de antifúngico las fases obtenidas de la separación por polaridad en columna de HPLC del P3; H₂O, EtOH25, EtOH50, EtOH75 y EtOH100 según las concentraciones indicadas en la Tabla 4.6. B) Ensayo de formación de colonias macroscópicas en medio YPD sólido correspondiente a esas fracciones.

Los resultados fueron bastante concluyentes; la fracción EtOH75 presentó una elevada capacidad antifúngica (Figura 4.36) y el resto de fracciones no mostró actividad alguna, lo que concuerda con lo esperable tras la observación de los cromatogramas

correspondientes. No obstante, es preciso poner de manifiesto el efecto de la diferencia de concentraciones pues la cantidad y la naturaleza de compuestos activos presentes en cada fracción no es igual (ver Tabla 4.6) debido a que el reparto de éstos en cada una de las fracciones no tiene porqué ser equitativo ni contener una distribución uniforme. Por tanto, es lógico plantear la posibilidad de que los resultados obtenidos puedan estar seriamente influenciados por las concentraciones dispares y no por el compuesto concreto. Para intentar disipar estas dudas se llevó a cabo un experimento similar al anterior, en el que se utilizaron unas concentraciones más homogéneas (resultados no mostrados). Estas concentraciones vinieron determinadas, lógicamente, por la de la fracción EtOH25, donde la masa de componentes del propóleo fraccionado era menor (Tabla 4.6). Como resultado, las fracciones no mostraron actividad, probablemente debido a la necesidad de alcanzar una concentración mínima o umbral, superior a la empleada.

Se volvió a repetir todo el proceso de fraccionamiento del P3 (ajuste volumétrico del residuo pesado tras la concentración en el rotavapor y diluido con volúmenes apropiados a la masa pesada) y los resultados se muestran en la Tabla 4.7.

Tabla 4.7. Concentraciones ($\mu\text{g/ml}$) de masa total de las fracciones separadas y utilizadas en la experimentación cuyos resultados se recogen en la Figura 4.35. Las concentraciones de las fracciones son proporcionales a las que tienen de cada una de ellas dentro del P3, calculadas experimentalmente al realizar el fraccionamiento del P3, tal y como se ha realizado anteriormente.

| MUESTRAS / FRACCIONES | CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g/ml}$) | PORCENTAJE DEL TOTAL EN P3 (%) |
|----------------------------------|--|---|
| P3 | 200 | - |
| H₂O | 5,04 | 2,52 |
| EtOH25 | 3,78 | 1,89 |
| EtOH50 | 10,70 | 5,35 |
| EtOH75 | 39,46 | 19,73 |
| EtOH100 | 47,66 | 23,83 |

La Figura 4.37 muestra la actividad *anticandida* detectada en estas fracciones. En ella se ratifican los resultados previos respecto a la fracción que contiene los componentes activos, EtOH75, que en esta nueva serie de experimentos es incluso más activa que el P3.

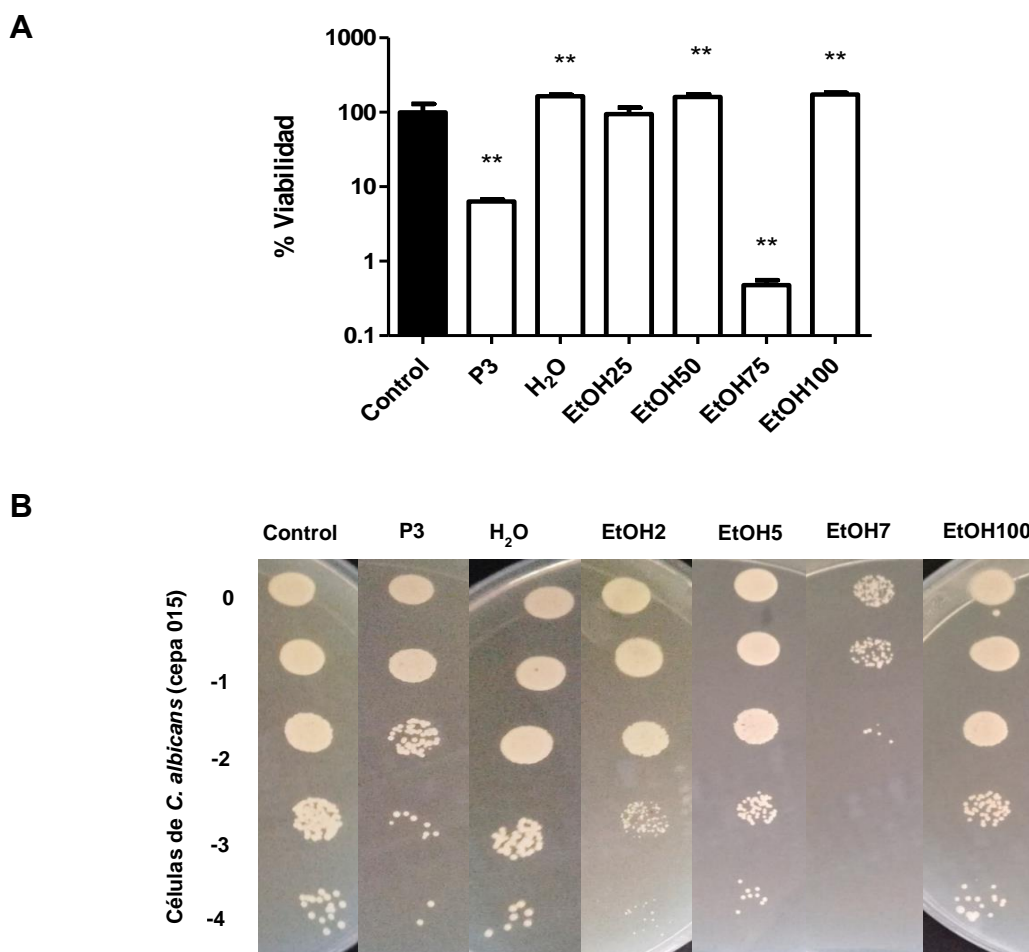


Figura 4.37. A) Ensayo de viabilidad en medio líquido con la cepa 015 de *C. albicans* siguiendo el protocolo estipulado y utilizando las concentraciones recogidas en la Tabla 4.7. B) Ensayo de formación de colonias macroscópicas en medio YPD sólido.

4.3.3 La sinergia con CA tras el fraccionamiento

Los datos correspondientes a la mayor actividad de la fracción EtOH75 respecto al P3 íntegro fueron inesperados y sorprendentes. No obstante, se decidió estudiar el efecto de

dichas fracciones en combinación con el ácido carnósico pues era posible pensar que el efecto sinérgico entre P3 y CA podría perderse al darse el caso de que el P3 contuviera algún inhibidor del crecimiento celular que haya desaparecido en la fracción EtOH75 y que fuera contrarrestado por el CA dando lugar al efecto sinérgico. En cualquier caso, era fundamental comprobar la existencia de sinergismo con todas las fracciones, por lo que se tomaron las mismas concentraciones del ensayo anterior y se les adicionó CA (50 $\mu\text{g/ml}$). Los resultados se muestran en la Figura 4.38.

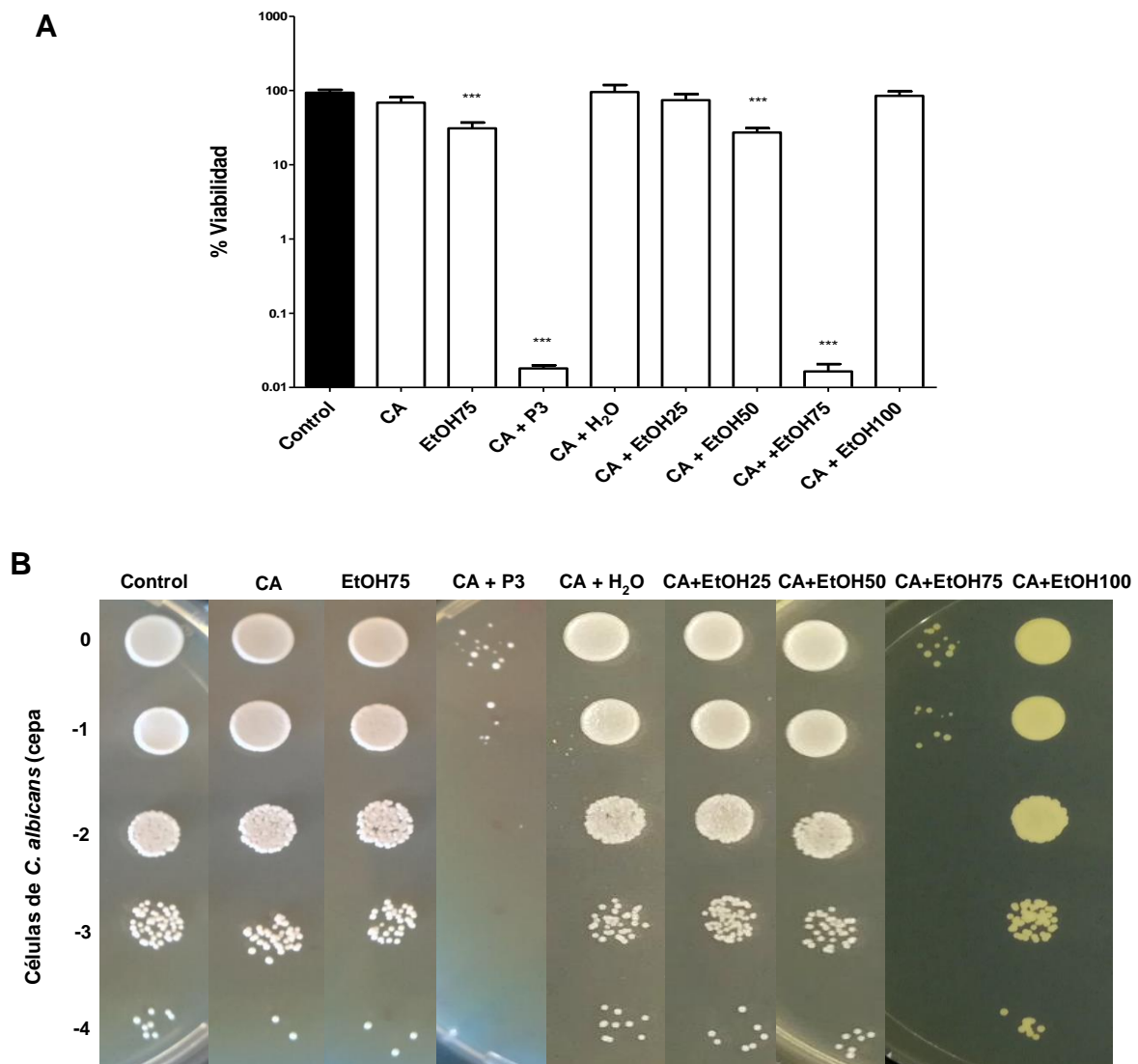


Figura 4.38. A) Ensayo de viabilidad en medio líquido con la cepa 015 de *C. albicans*. Los antifúngicos utilizados fueron las fracciones del P3 (Figura 4.35) pero combinadas con CA a las mismas concentraciones (ver Tabla 4.7). B) Ensayo de formación macroscópica de colonias en medio YPD sólido.

Como se puede observar (Figura 4.38), la fracción EtOH75 también mostró un grado de sinergismo con CA equivalente al propóleo P3 completo. Dicho sinergismo es claro, dado que ni el ácido carnósico a 50 $\mu\text{g/ml}$, ni EtOH75 tienen gran actividad por separado, pero si la muestran cuando ambos están presentes. Por otra parte, la actividad antifúngica es muy similar a la mostrada por el sinergismo CA+P3, a pesar de que la concentración empleada utilizando la fracción EtOH75 es claramente inferior a la concentración del extracto íntegro P3 (ver Tabla 4.7).

Ahondando más en esta línea, se llevó a cabo un estudio adicional de comparación de los efectos sinérgicos a diferentes concentraciones, seleccionando rangos adecuados en los que poder apreciar diferencias claras entre el efecto aditivo y el efecto sinérgico. La Tabla 4.8 muestra las concentraciones elegidas y la Figura 4.39 los resultados obtenidos.

Tabla 4.8. Concentraciones ($\mu\text{g/ml}$) de los compuestos y fracciones utilizadas en el experimento microbiológico cuyos resultados se muestran en la Figura 4.39.

| MUESTRAS / FRACCIONES Y CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g/ml}$) | | | |
|--|-----------|-----------|---------------|
| | CA | P3 | EtOH75 |
| 50CA+200P3 | 50 | 200 | |
| 25CA+100P3 | 25 | 100 | |
| 50CA | 50 | | |
| 25CA | 25 | | |
| 5CA+20EtOH75 | 5 | | 20 |
| 10CA+40EtOH75 | 10 | | 40 |
| 25CA+100EtOH75 | 25 | | 100 |

Los resultados fueron inequívocos: EtOH75 es la fracción responsable del sinergismo y posee gran capacidad antifúngica. Además, aproximadamente, la concentración de 25 $\mu\text{g/ml}$ de CA junto con 100 $\mu\text{g/ml}$ de EtOH75 (relación 1:4) parece ser la óptima para que se produzca la inhibición apreciable de la viabilidad celular. Las combinaciones de 10:40 y

5:20 $\mu\text{g/ml}$ (CA:EtOH75) mostraron un efecto muy débil y poco significativo. Como ya se discutió previamente, la Figura 4.39 demuestra que existe una concentración mínima para que el efecto antifúngico sea relevante, y además se observa que la relación dosis-efecto no es lineal incluso en presencia del ácido carnósico para que tenga lugar el efecto sinérgico.

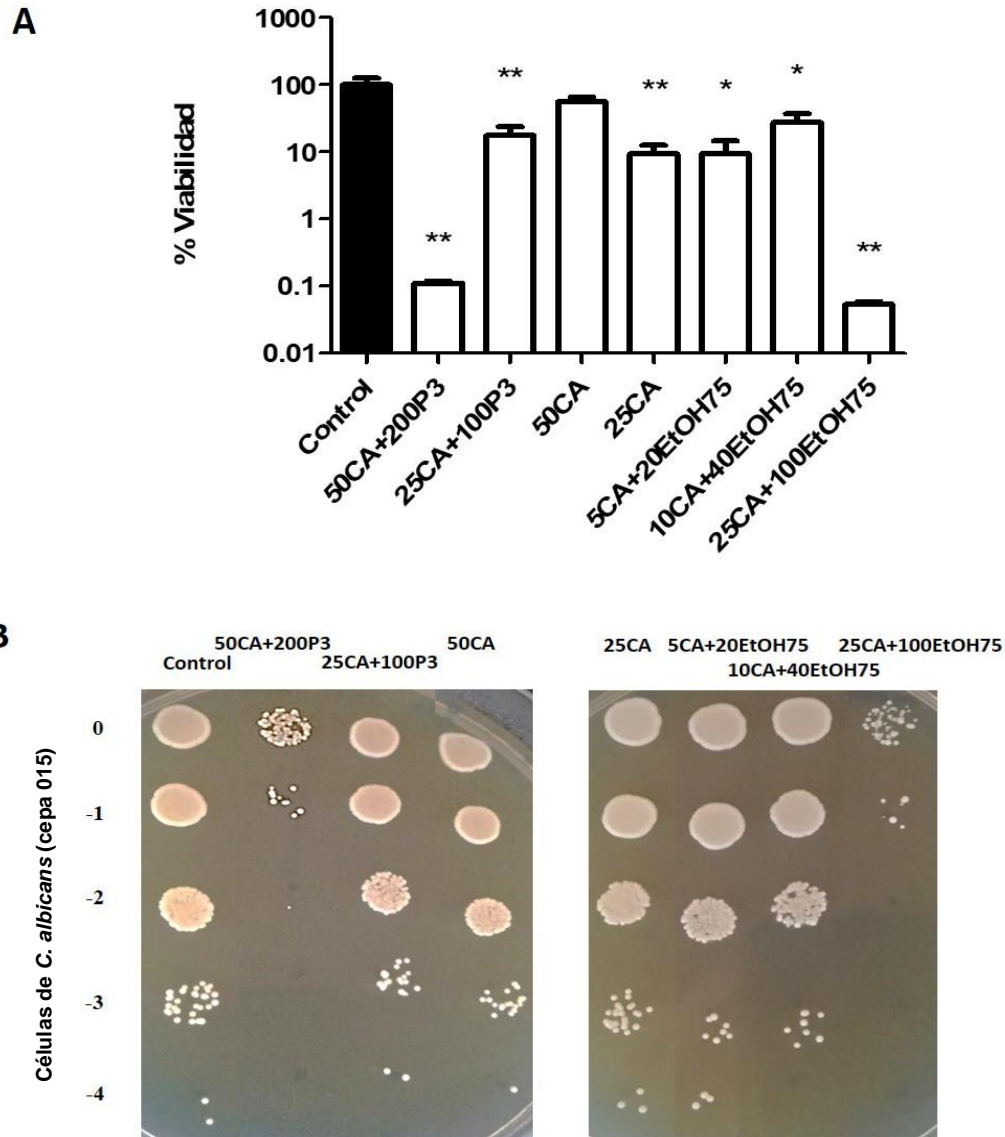


Figura 4.39. A) Ensayo de viabilidad en medio líquido con la cepa 015 de *C. albicans* siguiendo el protocolo habitual. Los antifúngicos utilizados fueron la fracción EtOH75 de P3 combinada con CA en las concentraciones detalladas en la Tabla 4.8. B) Ensayo de formación macroscópica de colonias en medio YPD sólido.

4.3.4 Relación actividad-concentración: la concentración umbral

De acuerdo con lo discutido anteriormente sobre la necesidad de un nivel mínimo o umbral para poder detectar la actividad antifúngica de fracciones activas, se realizó una recopilación de las series de experimentos que se llevaron a cabo solamente con EtOH75 en diversas concentraciones y se construyó la gráfica mostrada en la Figura 4.40 que ilustra la relación entre dosis y respuesta antifúngica de la fracción EtOH75. Puede observarse como con dicha fracción, se necesita una concentración mayor de 100 $\mu\text{g/ml}$ para que el efecto observado sea de dos órdenes de magnitud, es decir, que la viabilidad de *C. albicans* quede reducida como máximo a 1% en la escala de los histogramas que se utilizan de forma rutinaria.

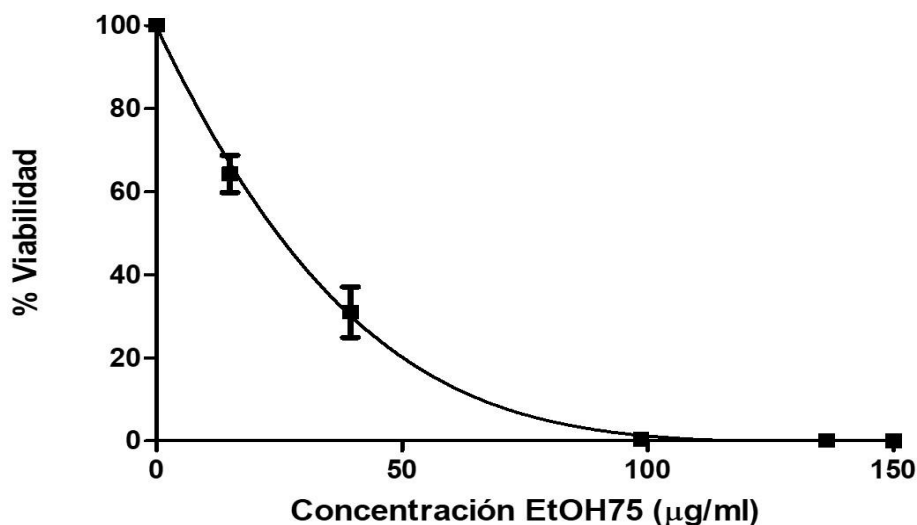


Figura 4.40. Relación obtenida entre la efectividad de la fracción EtOH75 sobre células de *C. albicans* (015) expresada como porcentaje de viabilidad según la concentración empleada.

La gráfica confirma que la relación no es lineal, tal y como sugerían los datos experimentales discutidos en apartados anteriores, ya sea en presencia o no de CA. En ausencia de éste, la viabilidad está por encima del 20% para concentraciones de EtOH75 inferiores de aproximadamente 50 $\mu\text{g/ml}$, lo que concuerda con lo discutido previamente.

4.3.5 Actividad de EtOH75 sobre *C. neoformans*

Alcanzado este punto, se decidió estudiar la actividad y el sinergismo de la fracción EtOH75 con otro de los microorganismos objeto de estudio: *C. neoformans*, para confirmar que el efecto es general sobre hongos. Dadas las experiencias previas, se decidió experimentar directamente con la combinación de CA y cada una de las fracciones obtenidas por HPLC. Como puede apreciarse (Figura 4.41), la fracción que muestra cierta actividad es la EtOH75, aunque en este caso es mucho más limitada, por lo que *C. neoformans* parece ser más resistente que *C. albicans* a la combinación de CA y las fracciones del P3. Este comportamiento concuerda con las experiencias previas de actividad CA+P3 sobre *C. neoformans* descritas en el Apartado 4.3.5.

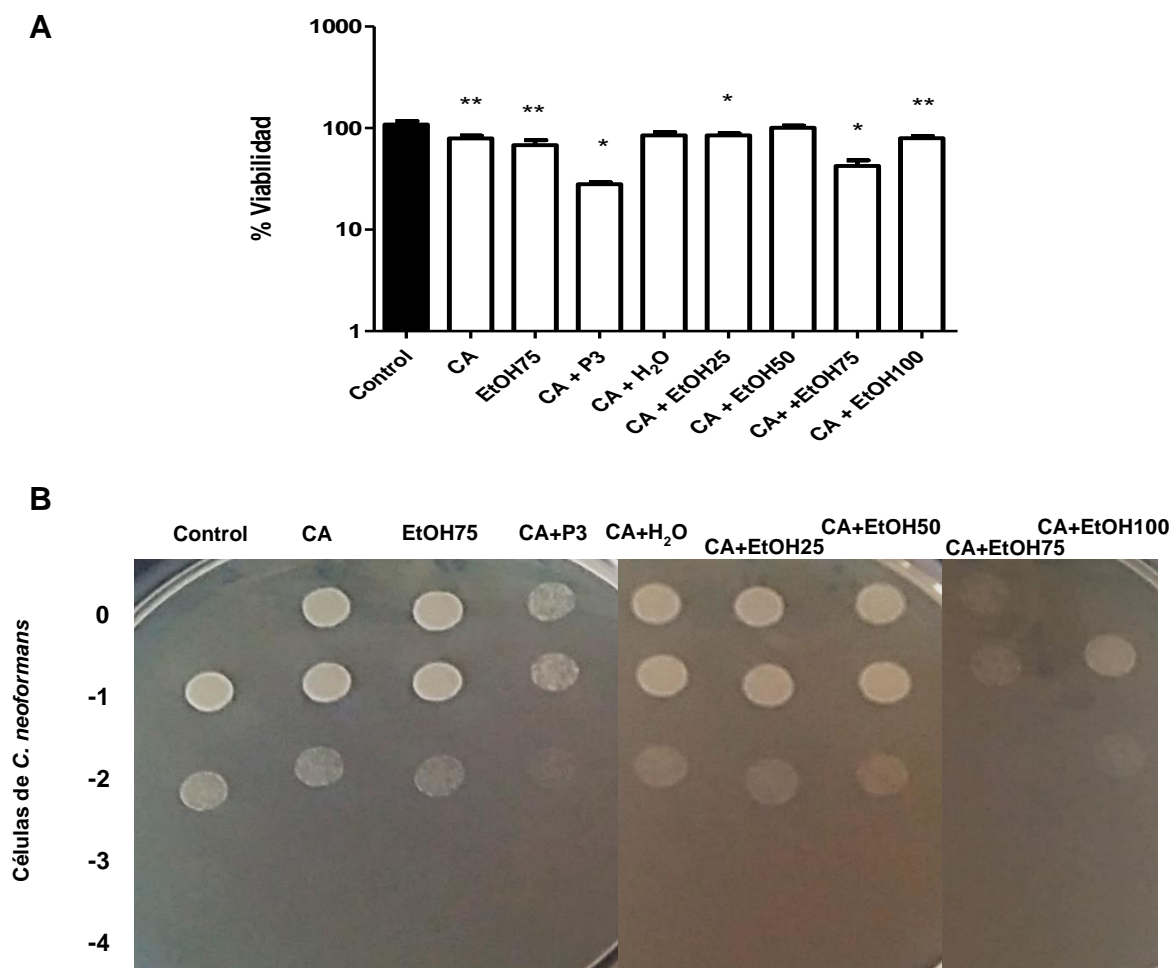


Figura 4.41. Ensayo de actividad antifúngica mediante la combinación de CA con las diferentes fracciones del P3 sobre la cepa H99 de *C. neoformans*. El procedimiento es análogo al de la Figura 4.38 con *C. albicans* utilizando las concentraciones recogidas en la Tabla 4.7.

4.3.6 Subfraccionamiento del P3

Como queda patente en el apartado previo, la fase más activa del propóleo P3 es EtOH75, que contiene los componentes del propóleo P3 que quedan absorbidos en el cartucho y eluyen a una concentración de etanol del 75%. Por tanto, esta fracción fue la única objeto de un nuevo fraccionamiento para acotar mejor el rango de solubilidad e intentar una mayor purificación de los agentes activos presentes en el propóleo. Para distinguir esta nueva etapa de la anterior, se denominará como “subfraccionamiento” y se llevó a cabo siguiendo el procedimiento detallado en el Apartado 3.2.8: partiendo del P3 se separaron las fracciones hasta la fracción EtOH50, a partir de la cual el contenido de etanol de la fase eluyente aplicada a la columna de fase sólida fue aumentado en incrementos del 5%, descartándose todo lo previamente separado y obteniéndose las siguientes subfracciones:

- EtOH55: eluida con un 55% de etanol
- EtOH60: eluida con un 60% de etanol
- EtOH65: eluida con un 65% de etanol
- EtOH70: eluida con un 70% de etanol
- EtOH75(2): eluida con un 75% de etanol

Es de reseñar la diferencia entre la fracción EtOH75 (que es la inicial del subfraccionamiento y contiene componentes del propóleo que eluyen entre el 50 y el 75%) y EtOH75(2) que es una subfracción de la anterior y contiene componentes que eluyen entre el 70 y el 75%. Además, en las separaciones iniciales se utilizó una fase móvil con un 80% de pureza de etanol que dará lugar a la subfracción EtOH80 por si también contuviera algunos componentes y fuera activa. En la Figura 4.42 se muestran los cromatogramas de todas las subfracciones anteriores a la longitud de onda rutinaria seleccionada para compuestos aromáticos, 280 nm:

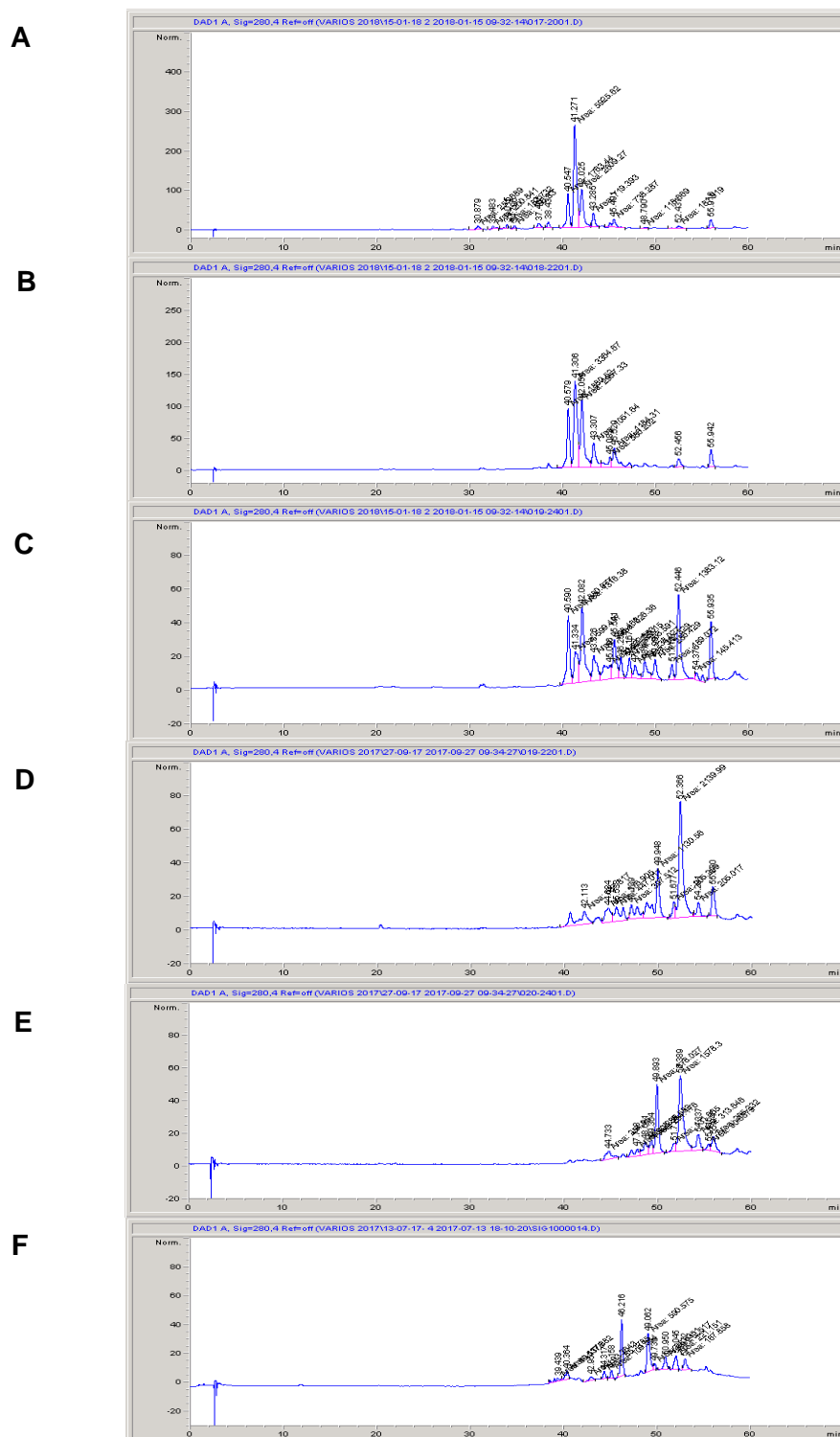


Figura 4.42. Cromatogramas obtenidos a 280 nm correspondientes al subfraccionamiento del P3. Las subfracciones separadas son: A) EtOH55, B) EtOH60, C) EtOH65, D) EtOH70, E) EtOH75(2) y F) EtOH80.

Al comparar estos perfiles con los obtenidos de las fracciones anteriores con incrementos de concentración del 25% del eluyente, y en concreto con la EtOH75 (Figura 4.35) de la que derivan estas nuevas subfracciones, se aprecia fácilmente como las subfracciones EtOH55 y EtOH60 presentan similitudes cualitativas con EtOH75 en la zona de componentes con tiempos de retención próximos a los 40 minutos, que es donde se encuentran preferentemente los polifenoles. Sin embargo, la siguiente subfracción EtOH65 comienza a diferenciarse más de la original, pues tiene mayor contenido en componentes más hidrofóbicos o de mayor tamaño, aquellos que eluyen por encima de 50 minutos, siendo EtOH70 todavía más rica en componentes de este perfil, que serán mayoritariamente di- y triterpenos. Además, las subfracciones restantes por encima del 70% de etanol no poseen apenas picos de absorción a 280 nm, por lo que la presencia de polifenoles parece ser escasa y en concentraciones pequeñas. Por tanto, *a priori*, es factible pensar que las subfracciones EtOH55, EtOH60 y EtOH65 podrían tener un potencial de acción *anticandida*, al contrario que las subfracciones EtOH70 y EtOH75(2).

4.3.7 Ensayos de actividad antifúngica con las subfracciones de P3

Siguiendo la metodología establecida en apartados anteriores, las concentraciones de antifúngico utilizadas tras el subfraccionamiento fueron proporcionales a las concentraciones de cada una de ellas en el extracto de propóleo original. Se calcularon mediante pesado de los residuos sólidos extraídos en la separación tras su concentración en el rotavapor y el vacuo-temp, tal y como se ha explicado anteriormente. En la tabla siguiente se recogen dichas concentraciones para un subfraccionamiento típico de los que se llevó a cabo:

Tabla 4.9. Concentraciones ($\mu\text{g/ml}$) de cada una de las subfracciones que representan la composición real del P3. Estos valores han sido los utilizados en los ensayos de actividad antifúngica cuyos resultados se muestran a continuación.

| FRACCIONES | CONCENTRACIÓN ($\mu\text{g/ml}$) |
|------------------|------------------------------------|
| EtOH55 | 34 |
| EtOH60 | 32 |
| EtOH65 | 22,5 |
| EtOH70 | 23 |
| EtOH75(2) | 25 |
| EtOH80 | 23,5 |

Con las concentraciones indicadas se llevaron a cabo los ensayos de actividad antifúngica de las subfracciones. De los resultados recogidos en la Figura 4.43 no puede extraerse una conclusión clara sobre la subfracción que posee mayor potencial frente a *Candida*. La fracción “madre” o inicial (EtOH75) presenta una muy notable actividad, mientras todas las subfracciones presentan actividades muy pequeñas o nulas, como si los componentes activos se hubiesen dividido entre todas las subfracciones. Analizando las condiciones del ensayo, se advierte que el reparto de los distintos componentes en las diferentes subfracciones da lugar a unas dosis muy bajas, hecho que daría una explicación coherente a estos datos, especialmente si se tiene en cuenta la hipótesis planteada anteriormente sobre la existencia de una relación dosis-efecto y del probable umbral mínimo a partir del cual las fracciones del P3 tienen una alta capacidad antifúngica. Es factible, por tanto, la posibilidad de que las concentraciones del experimento anterior se encuentren por debajo de ese umbral, especialmente en esta serie de ensayos realizada en ausencia de CA. También cabe considerar que la eficacia observada hasta ahora se fuera debida a la combinación de dos o más compuestos que pudieran haberse separado en dos fracciones durante este último subfraccionamiento. Es decir, que hubiera un cierto “sinergismo” dentro de los componentes del propio propóleo además del que se manifiesta con el CA.

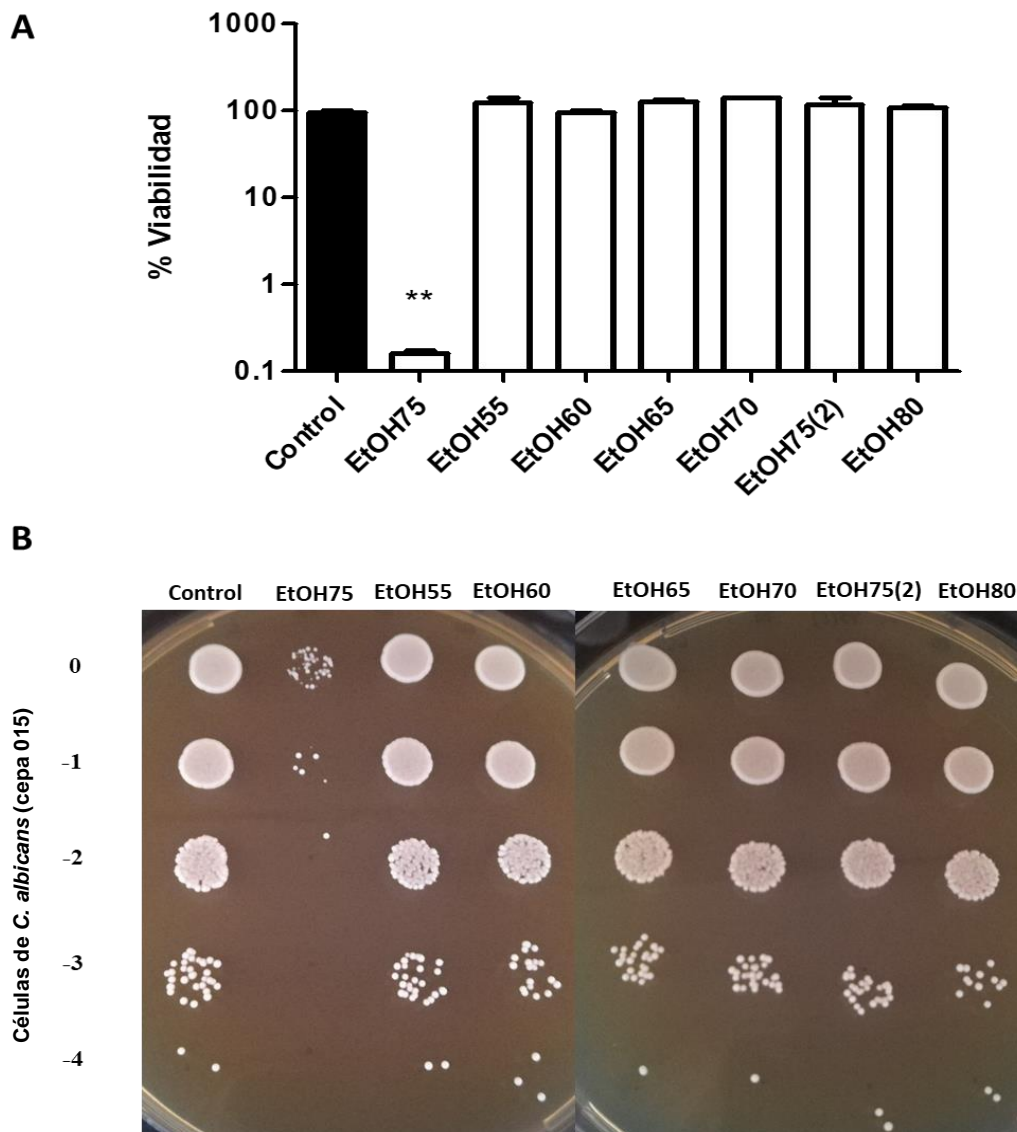


Figura 4.43. A) Ensayo de viabilidad en medio líquido con la cepa 015 de *C. albicans* siguiendo el protocolo habitual. Las concentraciones de las subfracciones están recogidas en la Tabla 4.9. B) Ensayo de formación macroscópica de colonias en medio YPD sólido.

Para determinar las subfracciones activas y explorar la posibilidad de un sinergismo o interacción positiva entre componentes del propóleo, se diseñó una serie de experimentos en donde todas las subfracciones estuvieran a una misma concentración (100 $\mu\text{g/ml}$) de acuerdo con el umbral de detección determinado anteriormente (Figura 4.40). Esa dosis se obtuvo mediante concentración de las subfracciones en rotavapor. Además, se incluyeron

dos alícuotas por combinación de subfracciones para introducir controles que facilitaran el posible seguimiento; la primera de ellas con las tres subfracciones con más probabilidad de ser más activas (EtOH55, EtOH60 y EtOH65), y la segunda es una reconstitución completa de la fracción original EtOH75 (suma de EtOH55+EtOH60+EtOH65+EtOH70+EtOH75(2)). El propósito de estas mezclas era intentar recabar indicios experimentales sobre la posible existencia de sinergismo entre compuestos contenidos en P3 o en EtOH75, pero separados en el subfraccionamiento realizado. Los resultados se muestran en la Figura 4.44.

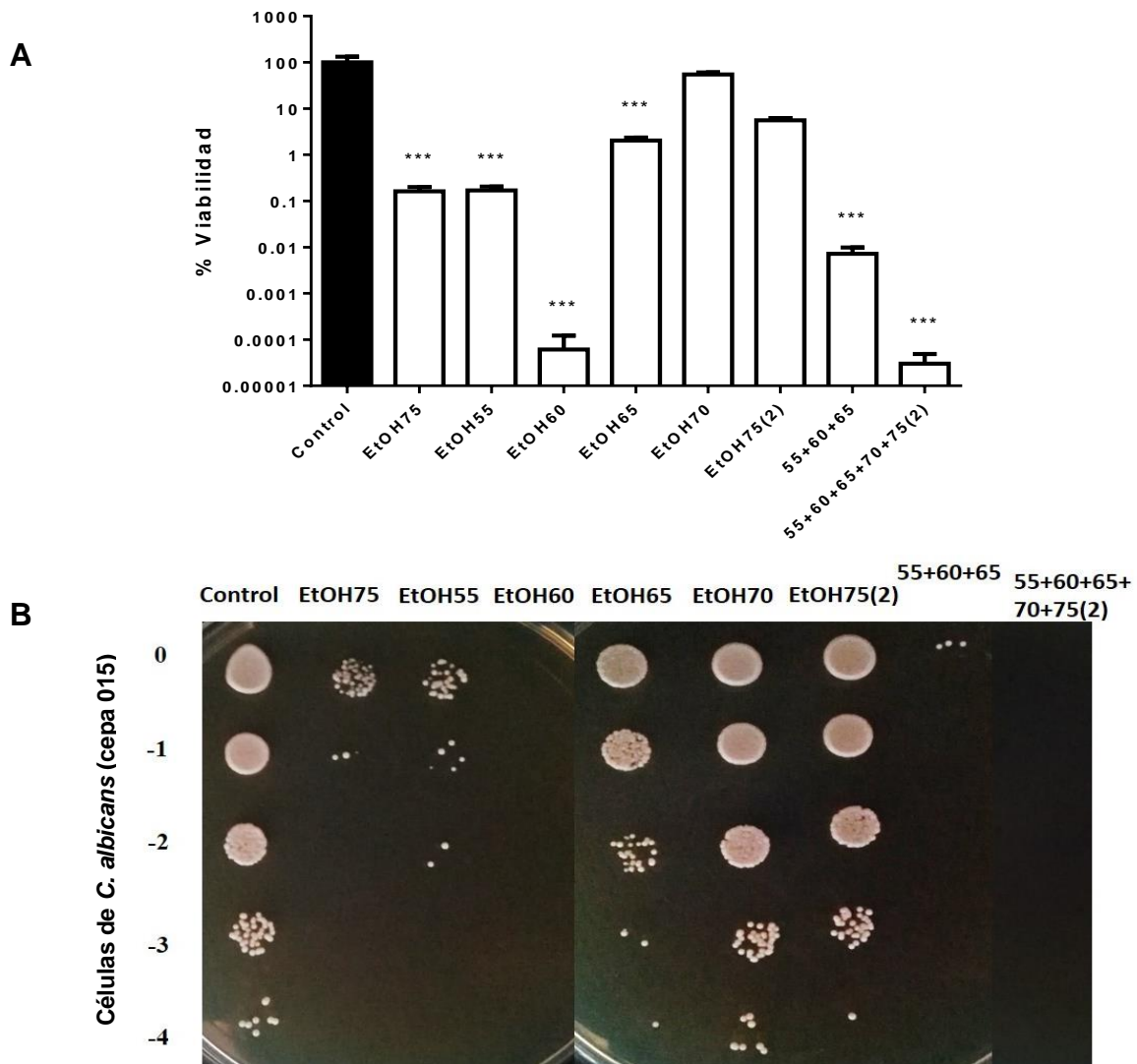


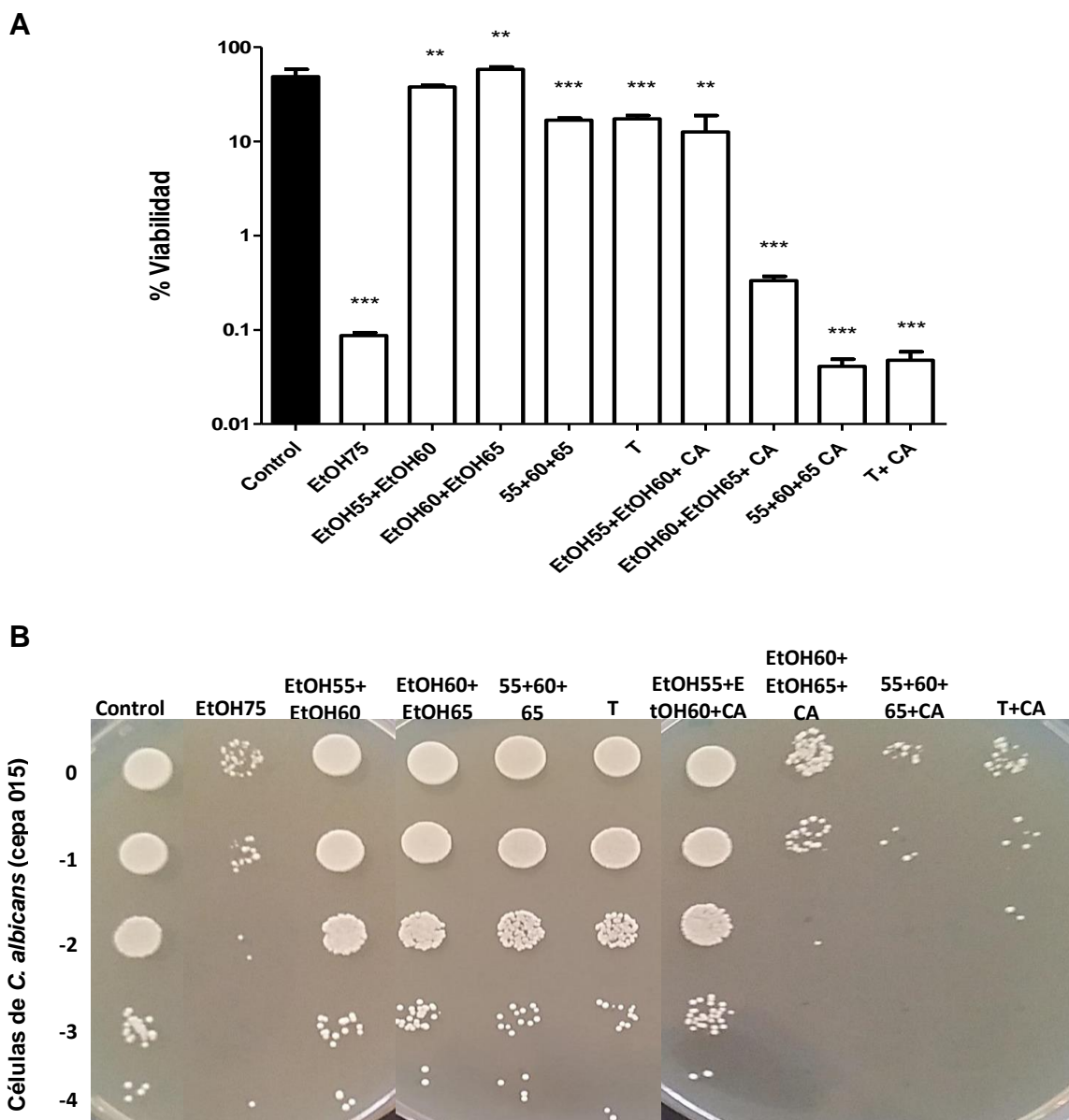
Figura 4.44. Ensayo de actividad frente a *C. albicans* (015) de las subfracciones a una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$. Además, se combinaron las tres primeras subfracciones EtOH55, EtOH60 y EtOH65 (55+60+65) por ser las que presentan un perfil cromatográfico más similar a la fracción original EtOH75, y también se ha reconstituido la fracción EtOH75 original (55+60+65+70+75(2)) a 100 $\mu\text{g/ml}$ cada una. A) Viabilidad (%). B) Ensayo de formación macroscópica de colonias en medio YPD sólido.

A igualdad de concentraciones y a estos valores claramente superiores al umbral, EtOH60 es, notablemente, la subfracción más efectiva frente a *C. albicans*, aunque la actividad está repartida, puesto que EtOH55 produce unos efectos similares a EtOH75 íntegra, e incluso EtOH65 muestra cierta actividad. De acuerdo con las expectativas que se deducían de la Figura 4.42, las fracciones EtOH70 y EtOH75(2) no poseen actividad antifúngica significativa. Es interesante el hecho de que EtOH60 mostrara una mayor actividad que EtOH75 original a la misma concentración, lo que indicaría que en esa subfracción EtOH60 existe una mayor pureza de los compuestos responsables de la capacidad antifúngica observada en esta Tesis Doctoral. Sin embargo, el comportamiento de las alícuotas obtenidas por reconstitución de varias subfracciones es complejo y algunos resultados son difíciles de interpretar, puesto que la reconstitución completa de EtOH75 a partir de todas las subfracciones es mucho más activa que la EtOH75 original.

Por otra parte, aunque la correlación entre el porcentaje de viabilidad y la formación de colonias macroscópicas es buena en términos generales, la Figura 4.44 muestra una excepción clara: la alícuota obtenida por mezcla de EtOH55, EtOH60 y EtOH65 es menos activa que EtOH55 sola en el ensayo de viabilidad (A) y más activa en el de formación de colonias (B), como parece lógico. Estas desviaciones pueden ser debidas a problemas experimentales, pero también son un reflejo de la complejidad de la acción antifúngica. En principio, dicha actividad podría no deberse a un solo compuesto, y además los efectos de los distintos componentes del propóleo activos parecen no ser aditivos.

Otra de las evidencias que se desprenden de los resultados anteriores, es la gran actividad observada en la reconstitución de EtOH75 frente a la fracción EtOH75 original. Sin embargo, la mezcla de EtOH55+EtOH60+EtOH65 no supera la actividad de EtOH60 por sí sola. En cualquier caso, desde el punto de vista de la rentabilidad económica de un potencial producto industrial, la concentración de 100 µg/ml de EtOH60 es más que suficiente para eliminar prácticamente toda la población celular de *C. albicans* y concentraciones mayores no mejorarían de forma apreciable la eficacia del tratamiento.

Para comprobar si el patrón sinérgico de los componentes de P3 de estas fracciones con el CA se mantiene, incluso en un estado de mayor pureza de dichos componentes, se llevó a cabo un experimento de combinación de las tres subfracciones más activas con CA (50 µg/ml), con los controles apropiados (Figura 4.45). Las concentraciones utilizadas fueron las representativas de cada subfracción dentro del P3 especificadas en Tabla 4.9.



Como era de esperar a esas concentraciones, los efectos “per se” de las distintas fracciones aisladas fueron muy débiles. Sin embargo, cuando actuaron de forma conjunta con CA. Los resultados muestran que el efecto sinérgico se produce tanto en la reconstitución total de la fracción EtOH75 original mediante la mezcla de todas las

subfracciones (EtOH55, EtOH60, EtOH65, EtOH70 y EtOH75(2) (que se denomina "T" de total en la Figura 4.45), como en mediante la combinación de las fracciones más activas (las 3 primeras EtOH55, EtOH60, EtOH65 con CA (barras a la derecha de la Figura 4.45).

Como último objetivo de este apartado, se estudió la actividad innata de las subfracciones, así como su acción conjunta con CA, para intentar concretar cuál era más activa (EtOH55 o EtOH60). Por otra parte, también se trató de calibrar la magnitud de los errores experimentales inherentes al método. Tras llevar a cabo nuevos subfraccionamientos, se realizaron ensayos de viabilidad estandarizando las concentraciones en 40 $\mu\text{g/ml}$ y para el CA en 50 $\mu\text{g/ml}$. Los resultados de los ensayos se muestran en la Figura 4.46 y la Figura 4.47.

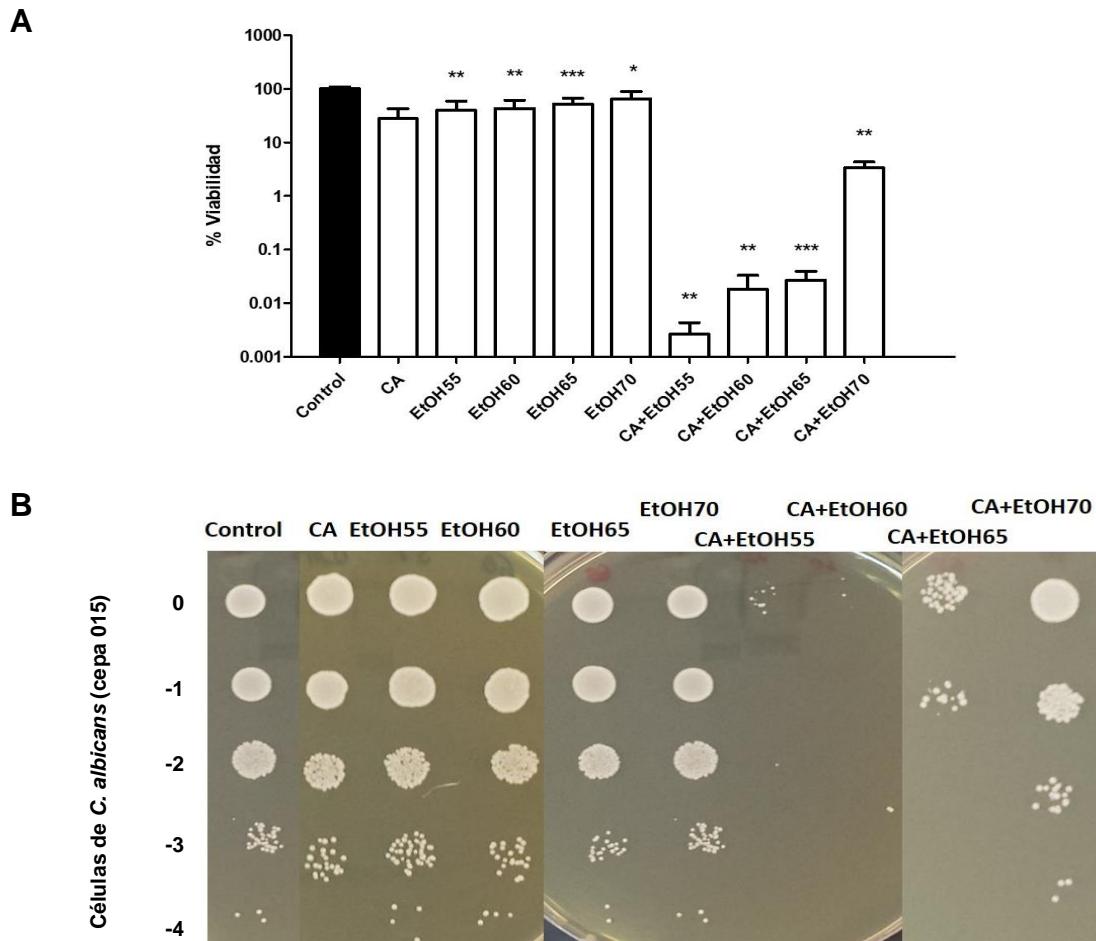


Figura 4.46. Ensayo de actividad antifúngica de las subfracciones EtOH55, EtOH60, EtOH65 y EtOH70 a una concentración de 40 $\mu\text{g/ml}$, tanto de forma individual como en combinación con CA (50 $\mu\text{g/ml}$) utilizando la cepa 015 (*C. albicans*). A) Viabilidad (%). B) Ensayo de formación de colonias macroscópicas en medio YPD sólido.

En principio, el comportamiento fue el esperable, con poca actividad intrínseca de las subfracciones aisladas y una notable mejoría cuando se combinaron con CA y se manifestó el efecto sinérgico. Como era lógico, las fracciones EtOH55 y EtOH60 fueron las más activas, pero mientras en la primera serie (Figura 4.46) el orden de eficacia antifúngica fue claramente EtOH55>EtOH60, en la segunda serie (Figura 4.47) fue al contrario EtOH60>EtOH55.

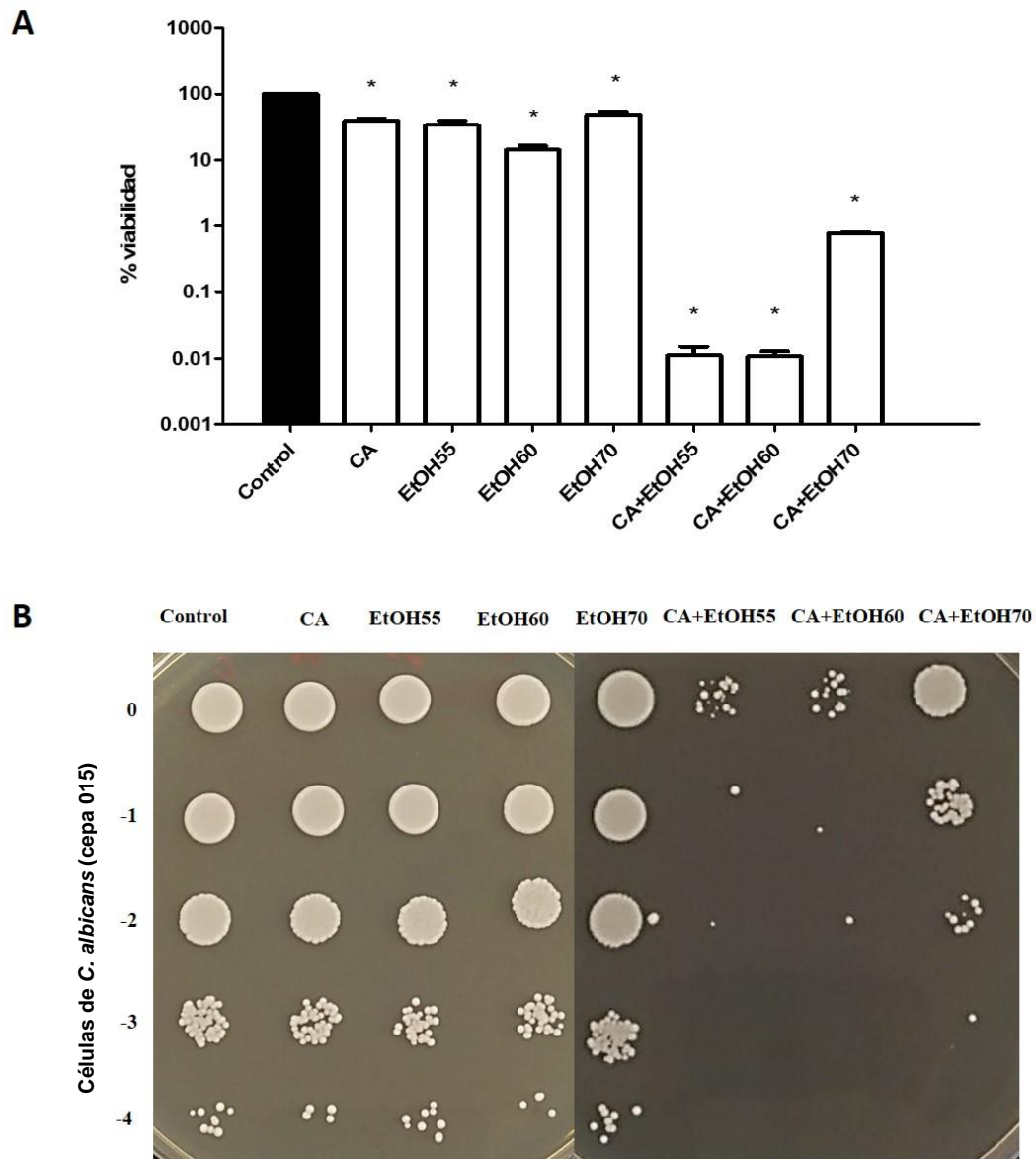


Figura 4.47. Ensayo de actividad antifúngica de las subfracciones más activas a una concentración de 40 $\mu\text{g/ml}$ sobre *C. albicans* (cepa 015). En algunas alícuotas se adicionó también CA (50 $\mu\text{g/ml}$) para estudiar los posibles sinergismos. A) Viabilidad (%). B) Ensayo de formación de colonias macroscópicas en medio YPD sólido.

Esto indica que las limitaciones cuantitativas del subfraccionamiento con etanol creciente en aumentos relativamente pequeños (del 5% en la etapa de subfraccionamiento), así como posibles errores experimentales, influyen cuando la escala de viabilidad es logarítmica, por lo que la localización exacta de los componentes más activos es difícil de determinar en una sola fracción. Éstos se reparten en las dos fracciones, es decir el punto de desorción de la fase sólida utilizada en este trabajo para subfraccionar el propóleo y semipurificar los compuestos antifúngicos se encuentra centrado sobre el 55% de etanol, y por tanto se reparte en las dos fracciones referidas. Incluso la fracción EtOH65 todavía contiene componentes activos, puesto que muestra sinergismo con CA (Figura 4.46), aunque con actividad claramente menor, siendo la de EtOH70 ya es casi inexistente.

4.3.8 Ensayos sobre otros hongos: *C. glabrata* y *C. neoformans*

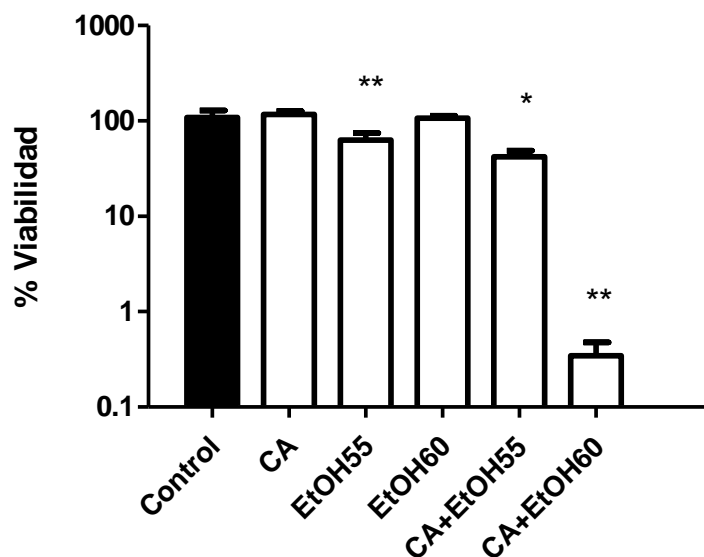
Para comprobar la capacidad antifúngica de las subfracciones y su posible sinergismo con CA en el tratamiento de otros patógenos distintos de *C. albicans*, se llevaron a cabo experimentos análogos, pero utilizando como cultivos diana *C. neoformans* y *C. glabrata*. Las Figura 4.48 (*C. neoformans*) y la Figura 4.49 (*C. glabrata*) muestran la actividad registrada en ausencia y en presencia de ácido carnósico. En ambos casos, los efectos de las fracciones EtOH55 y EtOH60 aisladas son bastante pequeños debido probablemente a la baja concentración de las preparaciones utilizadas en estas figuras, por debajo del umbral (40 µg/ml). Sin embargo, dichos efecto son suficientemente pronunciados cuando se aplicaron en combinación con el CA, ratificando el sinergismo en todas las cepas ensayadas.

Es de destacar que en el caso de *C. neoformans*, la viabilidad provocada por la adición de CA+EtOH60 es bastante inferior a la del resto de alícuotas, aunque aun así el sinergismo es evidente. Aunque es complejo extrapolar resultados de experimentos diferentes y para dos microorganismos distintos, *C. neoformans* parece ser algo más resistente que *Candida*, como ya se ha comentado en virtud de ensayos anteriores. En cualquier caso, la eficacia de la mezcla CA+EtOH60 sobre diferentes cepas es indiscutible.

Los resultados con *C. glabrata* guardan muchas similitudes con los de *C. albicans* a nivel cualitativo, pues el sinergismo es notorio y las subfracciones EtOH55 y EtOH60 son las más activas también en este caso. En general, la tendencia es muy parecida, aunque esta especie parece ser un poco menos sensible que *C. albicans*, lo cual es congruente con las conclusiones ya obtenidas en series anteriores. A nivel cuantitativo se pueden apreciar diferencias poco significativas.

Respecto a la comparación entre las dos fracciones, resulta llamativo que EtOH55 sea menos eficaz que la EtOH60 sobre *C. neoformans*, pero más eficaz sobre *C. glabrata*. Este comportamiento ratifica que los compuestos más activos se reparten entre las dos fracciones durante los diferentes subfraccionamientos llevados a cabo; a veces resulta más activa la EtOH60 y otras veces la anterior EtOH55. Por otra parte, también podría estar relacionado con las diferencias en la pared celular de ambas especies.

A



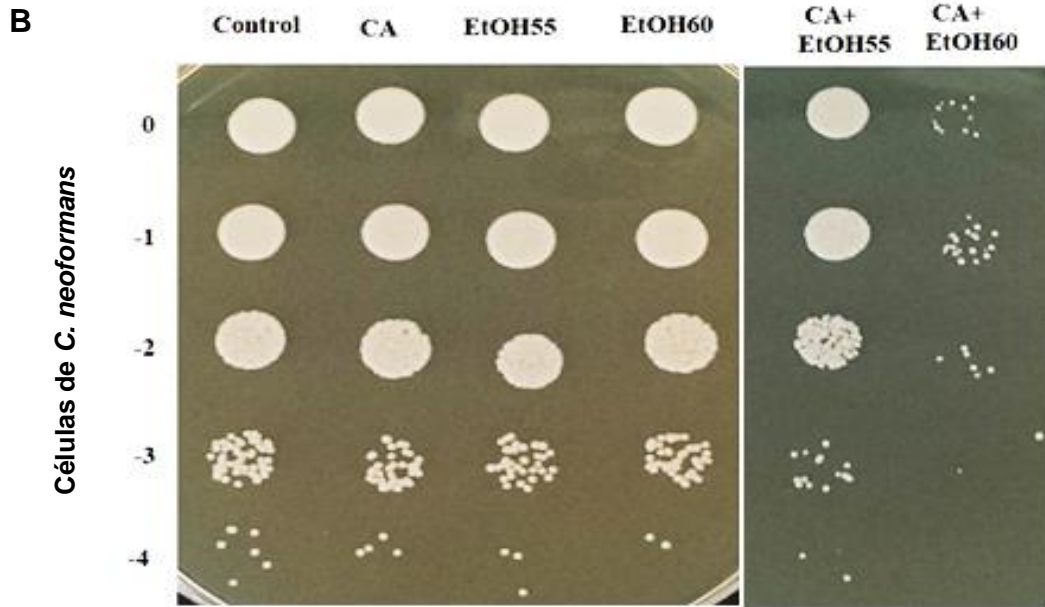
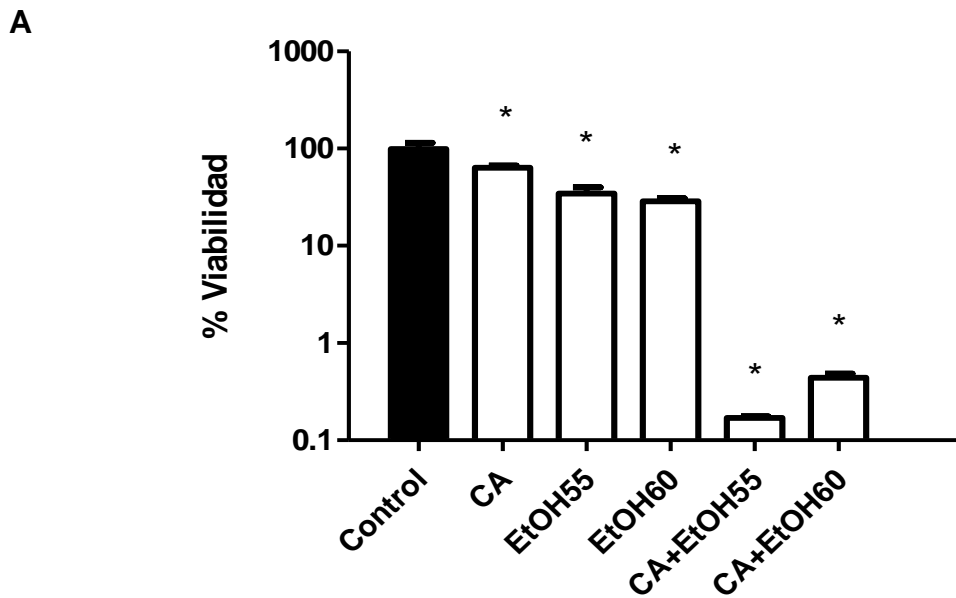


Figura 4.48. Ensayo de actividad antifúngica de las subfracciones EtOH55 y EtOH60 sobre *C. neoformans* a una concentración de 40 $\mu\text{g/ml}$. Se incluyeron alícuotas con CA (50 $\mu\text{g/ml}$) para estudiar los posibles sinergismos. A) Viabilidad (%). B) Ensayo de formación de colonias macroscópicas en medio YPD sólido.



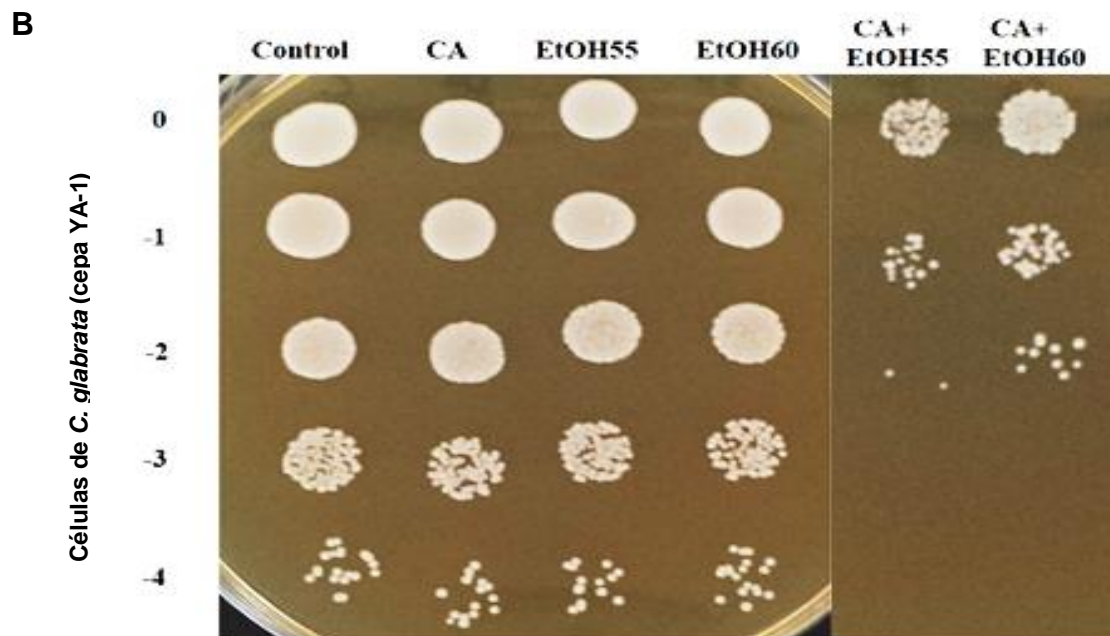


Figura 4.49. Ensayo de actividad antifúngica de las subfracciones EtOH55 y EtOH60 sobre *C. glabrata* (cepa YA-1) a una concentración de 40 $\mu\text{g/ml}$. Se adicionó también CA (50 $\mu\text{g/ml}$) para estudiar los posibles sinergismos. A) Viabilidad (%). B) Ensayo de formación de colonias macroscópicas en medio YPD sólido.

4.3.9 Recopilación de las principales conclusiones del fraccionamiento

Antes de proseguir con los siguientes apartados de esta Tesis Doctoral, se ha elaborado un resumen de las principales conclusiones que se pueden extraer del fraccionamiento y subfraccionamiento del propóleo P3 con disoluciones hidroalcohólicas de concentraciones crecientes, sería el siguiente:

1. El fraccionamiento del P3 realizado mediante incrementos progresivos del 25% de disoluciones de etanol, da como resultado que la fracción denominada "EtOH75" (que contiene componentes del propóleo que eluyen con una concentración de fase móvil superior al 50% de etanol y menor del 75%), es la que presenta la máxima actividad antifúngica.
2. Esa fracción EtOH75 conserva, en combinación con el CA, una intensa capacidad sinérgica en su acción antifúngica, indicando que dicho sinergismo proviene del complemento entre ciertos componentes del P3 y el CA, y no por eliminación de otros ingredientes del propóleo que pudieran actuar como inhibidores de la acción antifúngica.

3. Para que sea suficientemente efectiva la acción antifúngica de EtOH75 sin necesidad de adicionar CA, se requiere una concentración mínima en torno a 100 µg/ml. Por debajo de ese valor umbral, los efectos son detectables, aunque débiles, puesto que *C. albicans* conserva un nivel de viabilidad superior al 50%, que podría no ser suficiente para desarrollar antifúngicos a nivel industrial.
4. Separando EtOH75 se pueden obtener subfracciones, incrementando progresivamente un 5% la concentración de etanol de la fase eluyente a partir de P3. Las subfracciones más activas son EtOH55 y EtOH60, por lo que se puede concluir que los componentes del propóleo de mayor actividad antifúngica eluyen en torno a la región del 55% de etanol. Las fracciones por encima del 65% de etanol son totalmente descartables.
5. Todas las especies de hongos patógenos analizados en nuestro estudio son sensibles al tratamiento. Igualmente, en todas ellas la mezcla de las subfracciones activas con CA induce sinergismo. En general, *C. neoformans* parece ser ligeramente más resistente que *C. albicans* y *C. glabrata*, aunque debido al grado de sensibilidad del método experimental no es posible afirmar este punto.
6. La combinación de las subfracciones más activas con CA reduce la viabilidad de todas las cepas estudiadas, incluso a concentraciones más bajas que las empleadas con el propóleo. No obstante, su rentabilidad económica precisa de un análisis más profundo, ya que, si bien la materia prima del P3 es notablemente más asequible que el CA, los fraccionamientos industriales del P3 pueden encarecer demasiado el precio final del producto.

En consecuencia y de forma preliminar, no es posible elegir con certeza cuál de las dos subfracciones potencialmente candidatas es la más adecuada, y tampoco sus perfiles cromatográficos ayudan a decantar la balanza en un sentido, pues las diferencias cualitativas y cuantitativas, así como la absorción a 280 nm de los picos son mínimas. El subfraccionamiento por elución con etanol creciente de los cartuchos sólidos no puede optimizarse más. Por ello, se decidió recurrir a un análisis LC/MS tanto de ambas subfracciones (EtOH55 y EtOH60) como de la fracción original “madre” EtOH75, con el propósito de: (i) caracterizar e identificar los compuestos implicados en la actividad

anticandida; (ii) analizar su posible uso industrial, (iii) poder formular alguna teoría sobre los mecanismos responsables de la acción antifúngica.

4.3.10 Análisis LC/MS de las fracciones más activas de P3

Ante la mencionada imposibilidad de elegir una sola fracción con ciertas garantías, se analizaron por cromatografía líquida asociada a un espectrómetro de masas las que presentaron mayor actividad. A título ilustrativo, se muestran sólo los cromatogramas procedentes de la subfracción EtOH55. Como puede observarse, la mayor sensibilidad se obtuvo utilizando como método de detección en la espectrometría de masas el ESI (ionización por electro-spray) en modo negativo, aunque en algunos casos el modo positivo fue también de utilidad (Figura 4.50).

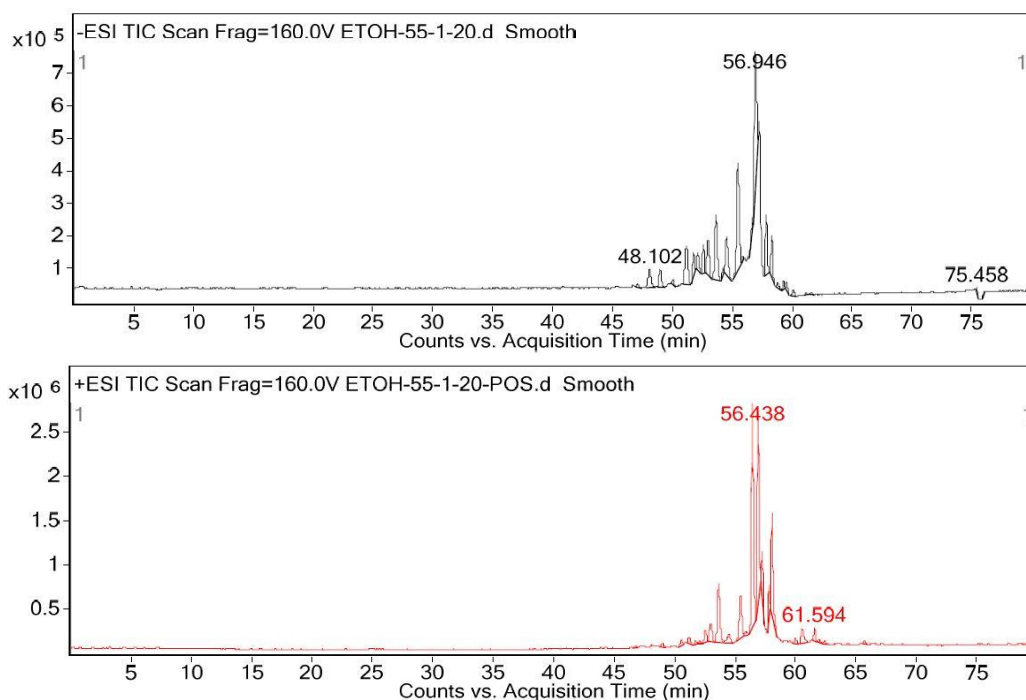


Figura 4.50. TIC (Total Ion Chromatogram) que corresponde a la suma de abundancias de todas las masas adquiridas para la subfracción EtOH55 en modo negativo y positivo respectivamente. El compuesto mayoritario presenta un tiempo de retención aproximadamente de 57 minutos en las condiciones asociadas a la cromatografía.

Con los datos obtenidos mediante espectrometría de masas, es posible vislumbrar con una elevada probabilidad, la naturaleza química de los compuestos activos del propóleo contenidos en forma semipura en las fracciones activas analizadas. Sin embargo, llegados a este punto, y dado que este trabajo constituye una Tesis con Mención Industrial, esa información no puede ser desvelada por cuestiones de confidencialidad al estar bajo secreto industrial y pendiente de patente. En tal caso, es importante destacar que la utilización de LC/MS proporcionó la masa molecular de algunos de los diferentes compuestos preseleccionados como los principios activos responsables de los resultados obtenidos. Además, se obtuvo información estructural adicional mediante comparación de los tiempos de retención con estándares introducidos en HPLC, por lo que LC/MS fue una herramienta esencial para avanzar en las identificaciones de dichos compuestos. En resumen, se seleccionaron tres *Candidatos* potenciales que fueron sometidos a ensayos microbiológicos análogos a los llevados a cabo hasta ahora para estudiar su efecto antifúngico y su posible sinergia con el CA.

4.3.11 Identificación y estudio de los posibles compuestos activos de P3

En base a los resultados anteriores, las moléculas activas debían estar tanto en el propóleo P3 completo, como en las subfracciones más activas (EtOH75 y sus derivadas EtOH55 y EtOH60), por lo que fueron seguidas mediante los tiempos de retención en la columna de HPLC y la altura de los picos en los correspondientes cromatogramas. Cotejando de forma minuciosa estos datos, los espectros de dichos compuestos y las especies m/z obtenidas por espectrometría de masas, se seleccionaron finalmente tres moléculas, que de ahora en adelante se denominan en la presente Memoria como X, Y y Z, con objeto de proteger su identidad por el proceso de solicitud de patente actualmente en curso.

Una vez seleccionados los candidatos, para investigar sus posibles efectos antifúngicos de forma pormenorizada, se adquirieron pequeñas cantidades de los tres, con la máxima pureza disponibles en Sigma-Aldrich:

- X: $\geq 95\%$ de pureza, grado analítico, HPLC
- Y: $\geq 97\%$ de pureza, grado analítico, HPLC

- Z: $\geq 97\%$ de pureza, grado analítico, HPLC

Se pesaron los mg adecuados de cada uno de ellos y se disolvieron en DMSO para su análisis por HPLC en las condiciones rutinarias utilizadas para el análisis de los propóleos, es decir, utilizando la misma columna C18 de fase reversa y las mismas condiciones de fase móvil descritas en Materiales y Métodos (ver Apartado 3.2.10). Según la confidencialidad industrial ya comentada y destinada a proteger la patente actualmente en gestión que pueda derivarse de estos estudios, la Figura 4.51 muestra el cromatograma obtenido mediante absorbancia a 280 nm de una mezcla de las tres moléculas disueltas a concentraciones comparables, aunque no exactamente iguales. Debido a su similitud estructural e hidrofóbica, las tres eluyen con tiempos de retención muy similares, entre 40-41 min (ver Figura 4.51), que es coincidente con la zona de elución de los compuestos activos que contienen tanto el P3 crudo, como la fracción EtOH75 o la subfracción EtOH55.

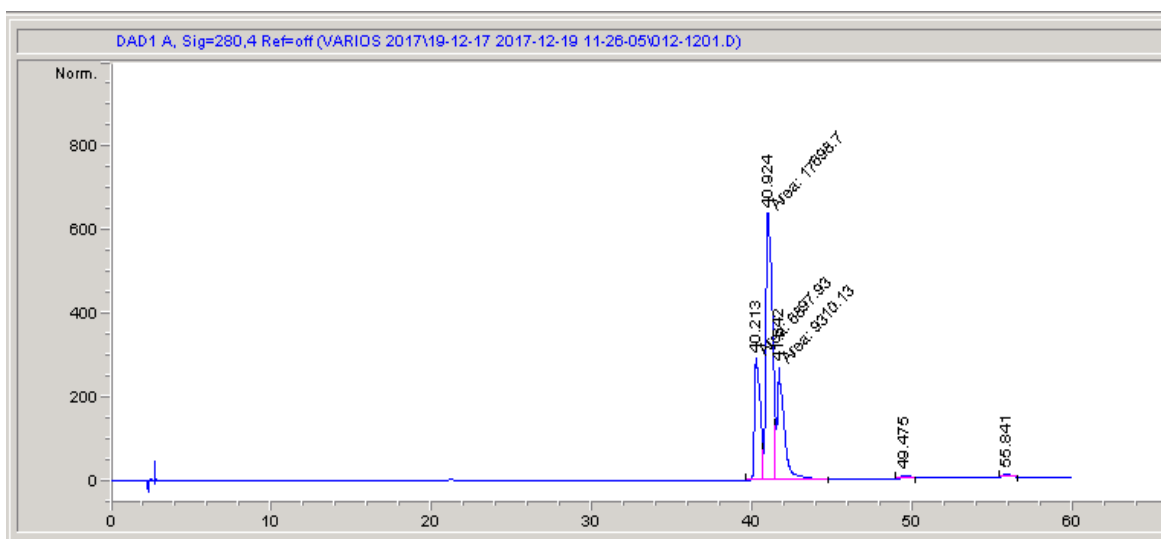
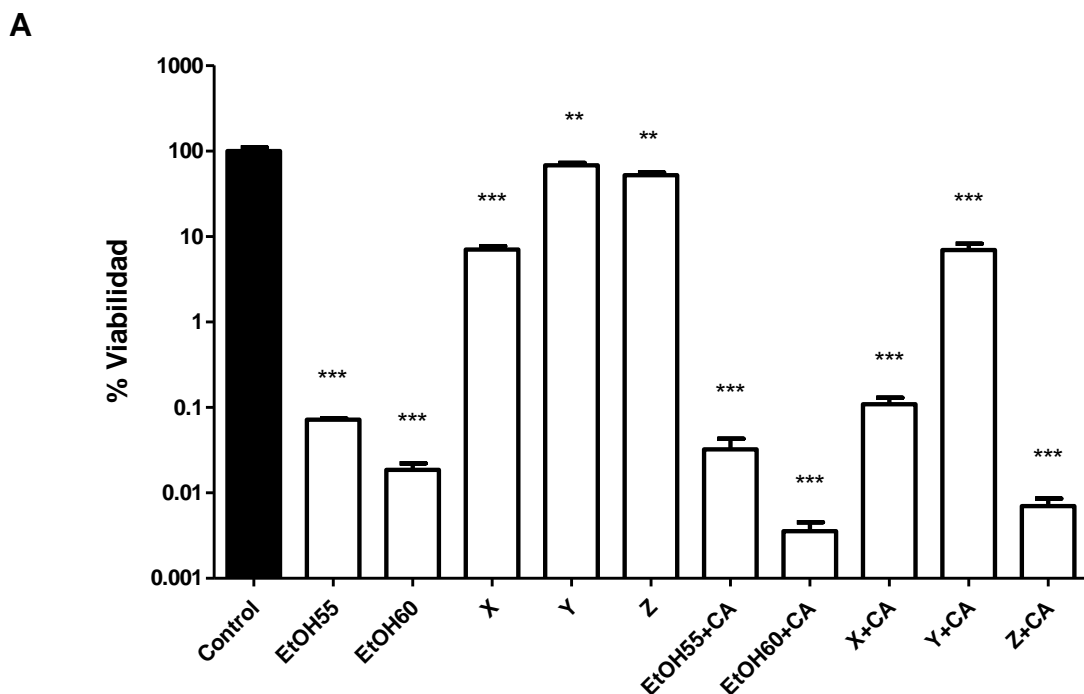


Figura 4.51. Cromatograma (HPLC) de una mezcla de los componentes del propóleo X, Y y Z registrado a 280 nm.

A continuación, se realizaron ensayos de actividad antifúngica similares a los llevados a cabo hasta ahora, tanto para cada compuesto de forma individual como en combinación con CA. Simultáneamente, con fines tanto de control como comparativos, se repitió todo el

proceso de fraccionamiento del propóleo P3 para obtener nuevas subfracciones EtOH55 y EtOH60, buscando constatar la presencia de X, Y y Z en los cromatogramas, y para comprobar que los datos obtenidos por LC/MS eran concordantes con los descritos anteriormente. También se hizo una cuantificación exacta de los factores de respuesta calculados a partir del cromatograma de la Figura 4.51, donde se puede conocer la altura de los picos y la concentración exacta teniendo en cuenta los mg disueltos y el volumen de DMSO empleado para la preparación de la muestra inyectada. La concentración empleada fue de 100 $\mu\text{g/ml}$ para los ensayos de los componentes aislados y de 40 $\mu\text{g/ml}$ en los ensayos de actividad combinada con 50 $\mu\text{g/ml}$ de CA. Para las fracciones utilizadas en paralelo EtOH55 y EtOH60, se usaron las mismas concentraciones, pero calculadas de forma empírica en función del peso medido tras concentración en el rotavapor por el procedimiento ya descrito anteriormente (ver Apartado 3.2.9). Los resultados se muestran en la Figura 4.52.



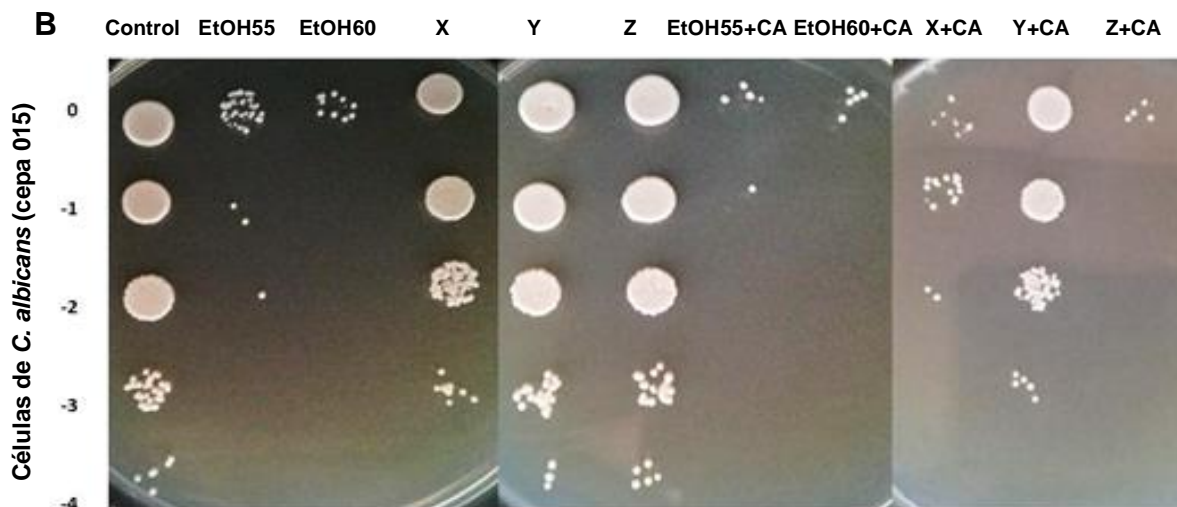


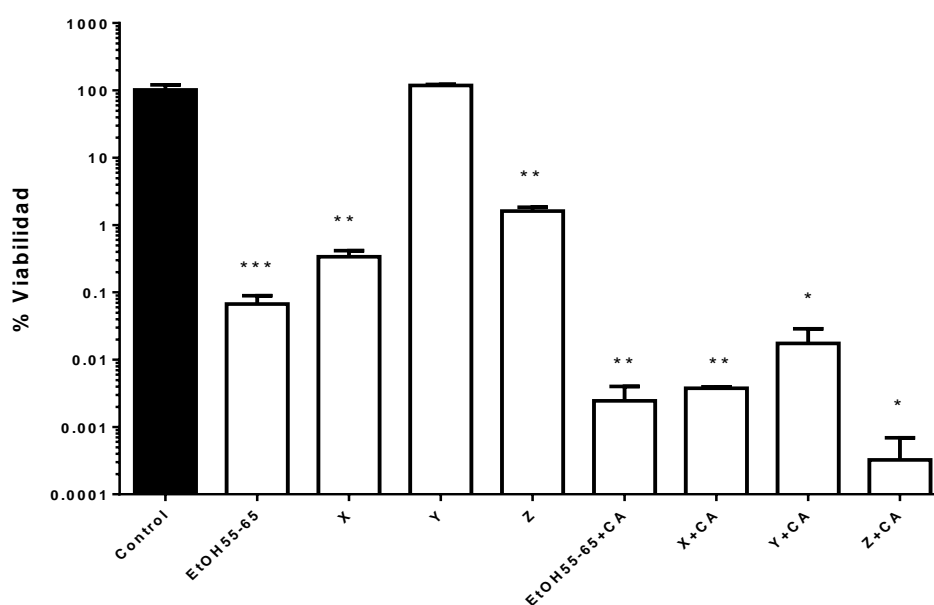
Figura 4.52. Ensayo de actividad antifúngica frente a la cepa 015 (*C. albicans*) de los compuestos X, Y y Z y las subfracciones EtOH55 y EtOH60 a una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ (actividad intrínseca) y de 40 $\mu\text{g/ml}$ (actividad en combinación con 50 $\mu\text{g/ml}$ de CA). A) Viabilidad (%). B) Fotografía del ensayo de formación de colonias macroscópicas en medio YPD sólido.

Se observa que los tres compuestos muestran *per se* una actividad antifúngica muy débil a la concentración indicada, aunque X parece ser más eficaz que Y y Z. Comparativamente, los resultados revelaron una mayor actividad de EtOH60 y EtOH55 que de los compuestos aislados, aunque debe tenerse en cuenta que estas subfracciones pueden contener muy probablemente, los tres compuestos juntos, e incluso algún otro. Mucho más importante que los efectos intrínsecos eran los efectos en combinación con el CA. Si se atiende a la serie ensayada en combinación con ácido carnósico para detectar posibles sinergismos, el compuesto Z mostró claramente más eficacia, con una actividad antifúngica que disminuye la viabilidad de la cepa de *C. albicans* ensayada unos 4 órdenes de magnitud (del 100% al 0.01%), si bien la muestra que provocó una mayor reducción de la viabilidad celular fue EtOH60+CA. Los datos sugieren que la actividad antifúngica podría aumentarse por la presencia conjunta de varios componentes del propóleo, además del efecto sinérgico ya conocido que se produce por el CA.

Debido a la importancia de estos resultados para el diseño de un preparado con aplicación industrial, se realizaron ensayos adicionales para confirmar la reproducibilidad de los efectos de cada biomolécula concreta. Además, se introdujeron algunas variantes en

las nuevas series. Por ejemplo, se utilizó como muestra con actividad antifúngica control una fracción que contenía EtOH55, EtOH60 y EtOH65 juntas (EtOH55-65), con objeto de asegurar que se tenían todos los componentes activos del propóleo. Los resultados se muestran en la Figura 4.53, siendo muy similares a los obtenidos en la serie anterior: de nuevo X fue el compuesto con mayor actividad intrínseca en las muestras aisladas, pero en la serie de acciones combinatorias con CA, el compuesto Z fue el más activo. En este caso, incluso con un efecto mayor que el causado por la fracción EtOH55-65+CA, lo que pareció en principio bastante sorprendente pero estimulante para proseguir nuestras investigaciones. Estas variaciones entre ensayos lo que realmente confirmaron es que el efecto global es complejo si se quiere obtener una medida cuantitativa exacta, pero muy reproducible en cuanto a que el efecto antifúngico sinérgico se produce, y la viabilidad de la levadura patógena se reduce en aproximadamente en un factor de 10^4 a las concentraciones ensayadas, se utilice la subfracción obtenida del propóleo o se utilice la sustancia pura Z. Además, no existe correlación entre la acción intrínseca de componentes aislados y la combinación de los componentes con el CA, ya que en el compuesto X aislado es más activo que el Z aislado, pero este último es el más activo cuando se aplica en combinación con el CA; dicho en otras palabras, muestra el efecto sinérgico más potente, que es realmente el que tiene interés industrial para competir con los antifúngicos convencionales, el objetivo principal de este trabajo.

A



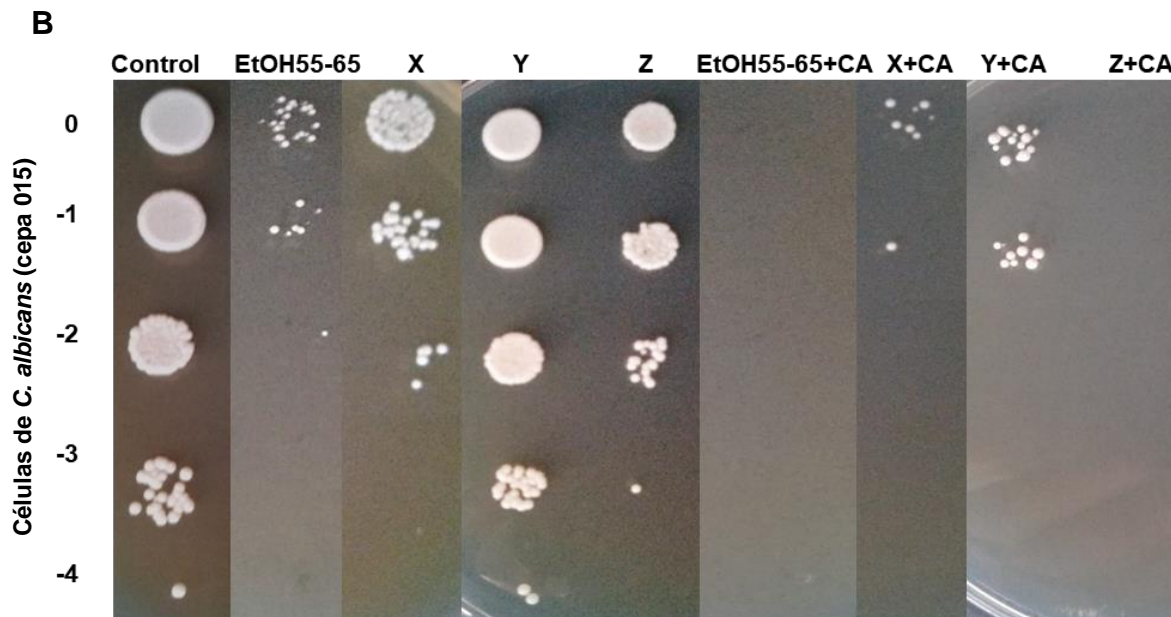


Figura 4.53. Ensayo de actividad antifúngica frente a la cepa 015 de *C. albicans* de X, Y y Z a una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ considerados aisladamente y combinados a 40 $\mu\text{g/ml}$ con CA (50 $\mu\text{g/ml}$). Como control positivo se incluyó una fracción a las mismas concentraciones, EtOH55-65, que comprende las subfracciones EtOH55, EtOH60 y EtOH65. A) Viabilidad (%). B) Ensayo de formación de colonias macroscópicas en medio YPD sólido.

También se estudió el comportamiento de X, Y y Z frente al otro hongo modelo de esta Tesis, *C. neoformans* (Figura 4.54) siguiendo la misma metodología empleada hasta ahora, obteniéndose un comportamiento concordante con el de *C. albicans* aunque en este caso Z fue la molécula que mayor efectividad presentó incluso en estado aislado, sin necesidad de combinarla con CA. En esta serie se empleó solo EtOH55 como control de eficacia de las fracciones obtenidas del P3. Cabe destacar que se apreciaron algunas peculiaridades significativas respecto a ensayos descritos anteriormente en esta Memoria. Por ejemplo, *Cryptococcus neoformans* mostró en estos ensayos una especial sensibilidad al tratamiento combinado, y tanto la fracción EtOH55 como Z produjeron una acción tóxica prácticamente total cuando se ensayaron junto con CA. Sin embargo, en ensayos de fracciones descritos en apartados anteriores, *C. neoformans* parecía un poco más resistente que *C. albicans* (ver Apartado 4.3.8). Además, en el tratamiento combinado, la molécula Y mostró más potencia que la X, aspecto diferencial con *C. albicans*. En resumen, tanto pequeñas diferencias experimentales en distintas series de ensayos como la naturaleza del

microorganismo diana son factores que afectan relativamente a la potencia de la actividad antifúngica de estas fracciones o moléculas elegidas, pero, en cualquier caso, la sinergia con el CA y la actividad antifúngica se mantiene.

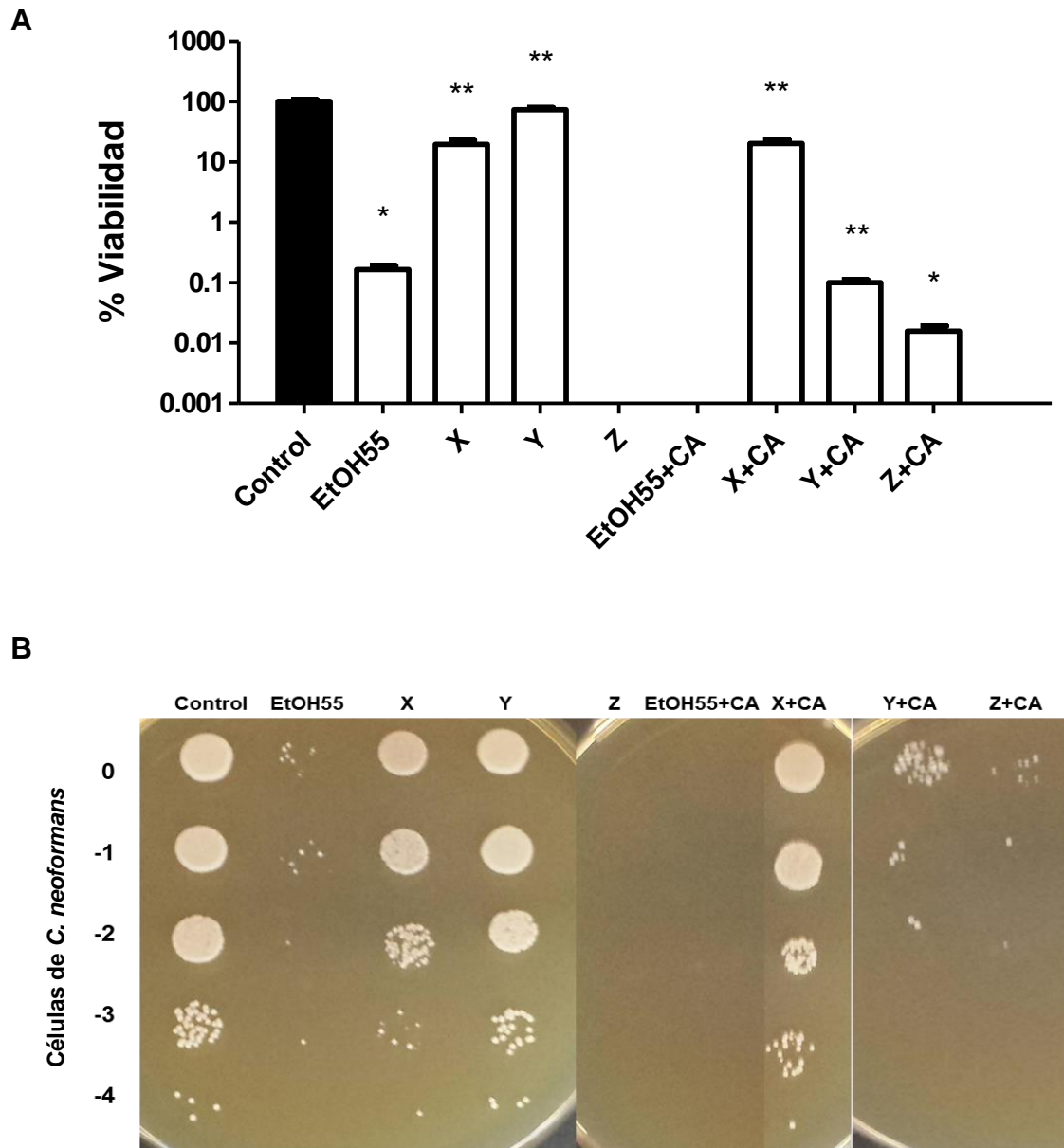


Figura 4.54. Ensayo de actividad antifúngica frente a *C. neoformans* de X, Y y Z a una concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ cuando se utilizaron individualmente y a 40 $\mu\text{g/ml}$ cuando se combinaron con CA (50 $\mu\text{g/ml}$). Como control positivo se utilizó la subfracción EtOH55 a las mismas concentraciones mencionadas. A) Viabilidad (%). B) Fotografía del ensayo de formación de colonias macroscópicas en medio YPD sólido.

4.3.12 Cinética y durabilidad de la acción antifúngica del potencial compuesto activo del propóleo y de sus preparaciones comerciales

Identificado el compuesto Z como el mejor candidato de los compuestos presentes en el propóleo para ejercer una acción antifúngica sinérgica con el CA, se realizaron las pruebas de actividad de Z en medio líquido transcurridos distintos tiempos tras el tratamiento inicial: 1, 5 y 24 h con el propósito de estudiar la evolución del efecto y establecer comparaciones con la cinética del P3 estudiada en apartados anteriores en lo que se refiere a durabilidad de la acción antifúngica. Debe recordarse que el efecto antifúngico es rápido, como se observó en las series rutinarias a 1 hora de incubación (Apartado 4.2.3), pero que posteriormente el efecto del propóleo sufre una pérdida de actividad y el crecimiento de *Candida* se recupera parcialmente, posiblemente por una degradación del CA o de los principios activos presentes en el propóleo responsables de la acción antifúngica (ver Apartado 4.2.3 y Apartado 4.2.7).

En estas nuevas series cinéticas, se incluyó además de Z con la mayor pureza posible (>97%, utilizado en el Apartado 4.3.11), una alícuota denominada Z(1), que corresponde a un extracto comercial que contiene Z, pero cuyo análisis por HPLC reveló un contenido bastante bajo de éste, aproximadamente 1,7%, (ver Apartado 4.5.3). Además del estudio cinético o de durabilidad de la acción antifúngica, el propósito de emplear extractos comerciales con un coste racional se debió a la necesidad de explorar estos aspectos teniendo en cuenta la variable económica para el uso de posibles fuentes de materia prima de Z viables desde el punto de vista de la producción industrial.

Los resultados de viabilidad y de formación de colonias macroscópicas se muestran en la Figura 4.55 y Figura 4.56 para 1, 5 y 24 h (A, B y C respectivamente). Los datos se han ordenado secuencialmente para facilitar la observación a lo largo del tiempo de exposición del hongo a los aplicados.

En primer lugar, y de forma bastante concluyente, se observa que la capacidad anticandida de Z es bastante mayor que Z(1), tanto en su acción aislada como combinada con CA. Ello está en concordancia con la mayor pureza de Z respecto a la preparación Z(1).

Analizando los resultados a 1 h de incubación (series A), y observando efectos aislados en ausencia de CA, Z a 200 µg/ml muestra cierta actividad, pero Z(1) a la misma concentración no. Cuando se analiza su combinación con CA, Z es activo incluso a las

concentraciones más bajas (10 µg/ml), y totalmente efectiva a 40 µg/ml mientras que Z(1) tiene un efecto muy ligero incluso a concentraciones altas, 200 µg/ml.

Si se alarga el tiempo de incubación del cultivo con los compuestos, se observa que efectivamente la capacidad antifúngica de Z va disminuyendo, y la de Z(1) prácticamente desaparece. De hecho, tras 5h (series B) el crecimiento celular sigue siendo inhibido en las muestras tratadas con Z+CA en concentraciones desde 10 hasta 40 µg/ml, pero a 24h (series C), solo la alícuota con mayor concentración de Z (40 µg/ml) conserva capacidad antifúngica. Ni Z, o por supuesto Z(1), con o sin CA muestran actividad tras este periodo de incubación. También es destacable, comparando tanto las cantidades de Z usadas en el ensayo como la riqueza de Z(1) calculada según su cromatograma, que al igual que ocurría con el P3 y la fracción EtOH, existe una concentración umbral a partir de la cual el efecto de Z es notable, aunque para el sinergismo Z+CA dicha concentración se ve rebajada ostensiblemente. Además, es clara la necesidad de aplicar el producto de forma periódica para mantener una viabilidad baja.

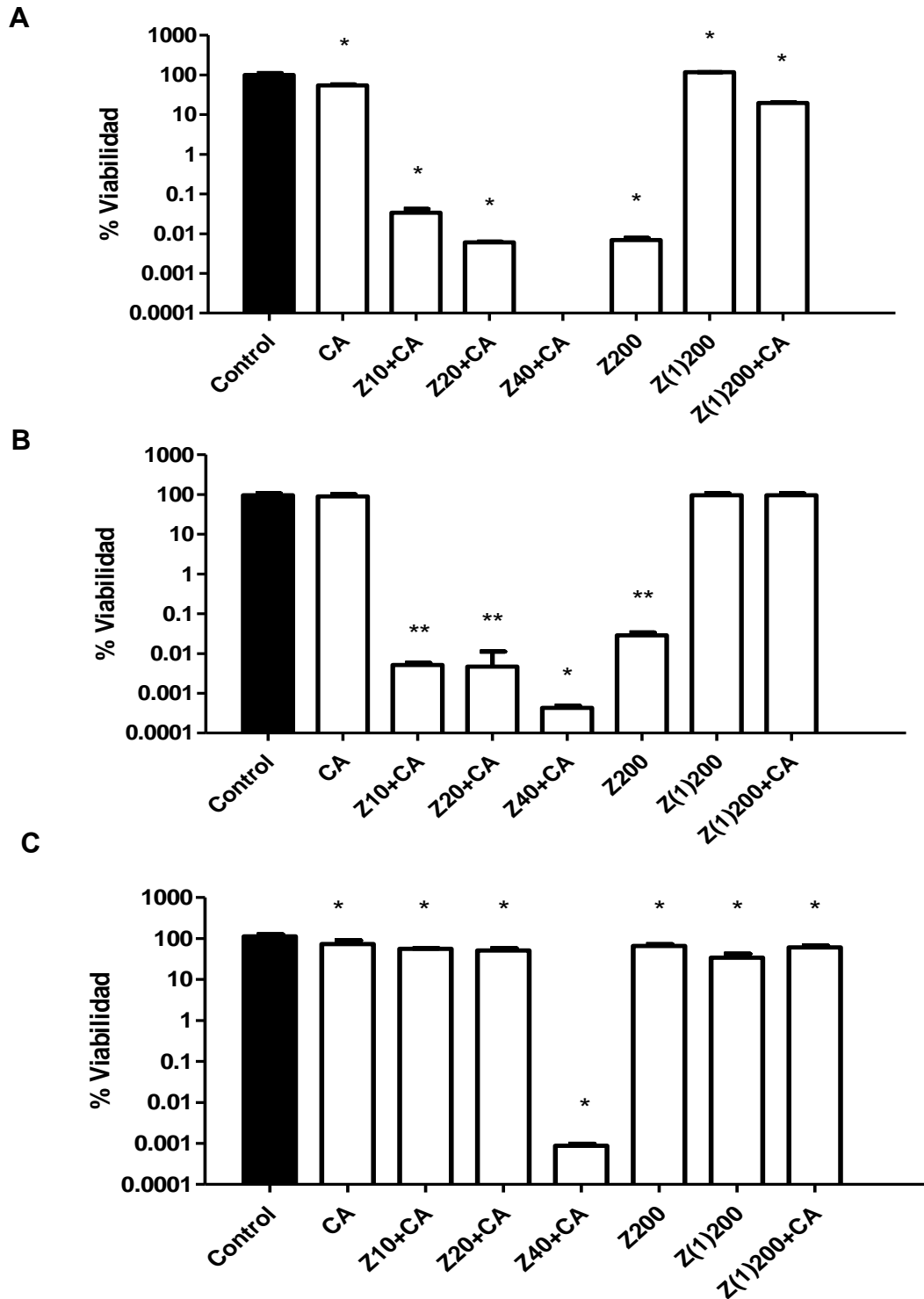


Figura 4.55. Ensayo de actividad antifúngica frente a la cepa 015 de *C. albicans* de Z a una concentración de 10, 20 y 40 $\mu\text{g/ml}$, combinado con CA (50 $\mu\text{g/ml}$). También se muestra el efecto de un extracto comercial, Z(1), a una concentración de 200 $\mu\text{g/ml}$ con y sin CA. El tiempo de exposición de las células al tratamiento antifúngico es de 1, 5 y 24 h, que corresponden a las Figuras A, B y C respectivamente. Los histogramas muestran la viabilidad celular (%).

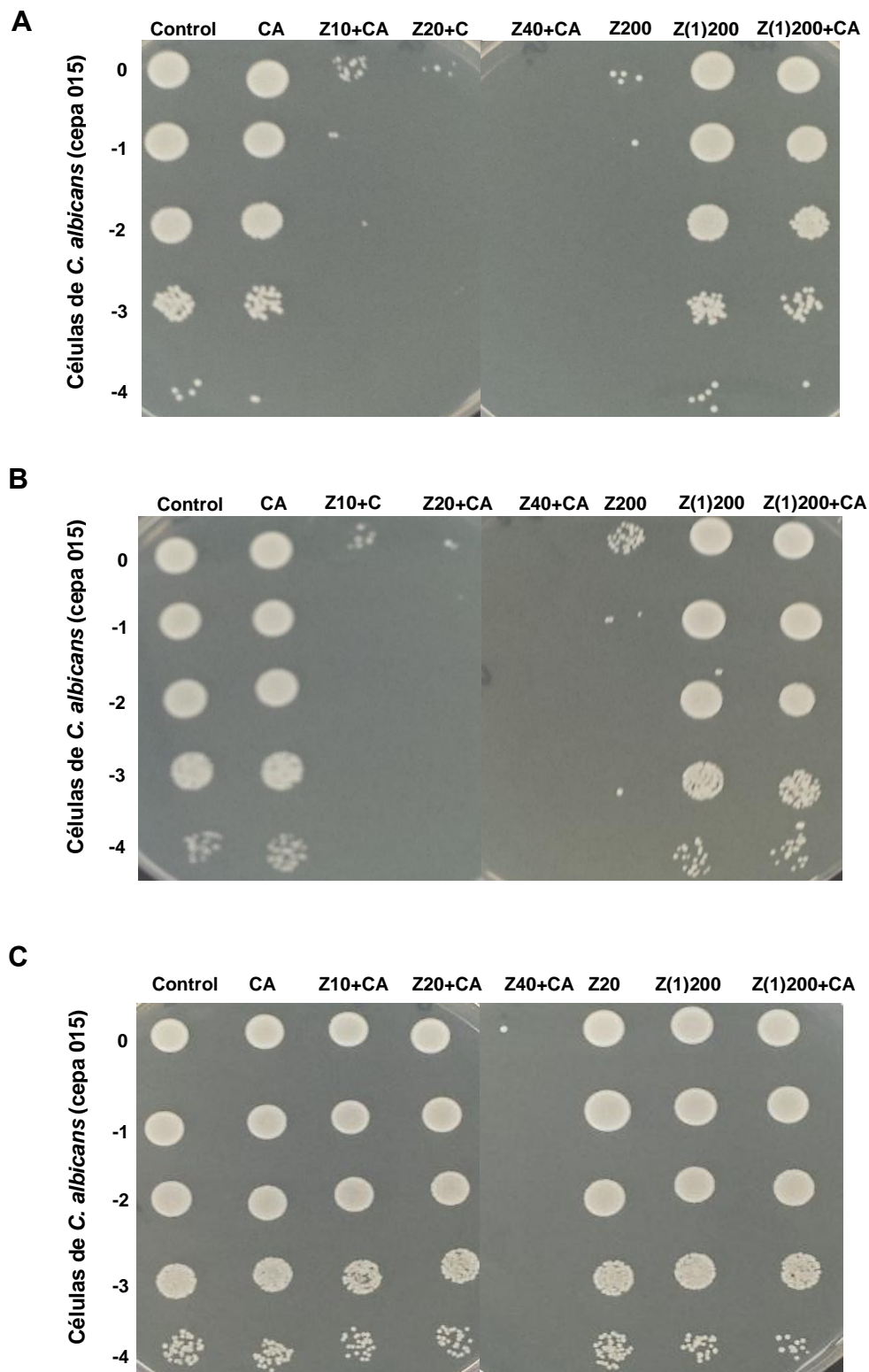


Figura 4.56. Fotografía del ensayo de formación de colonias macroscópicas en medio YPD sólido, utilizando las mismas alícuotas que en la Figura 4.55 anterior, y los mismos tiempos 1,5 y 24 h, que se correlacionan con las Figuras A, B y C.

Con las experiencias previas, es posible enunciar algunas hipótesis que expliquen los resultados observados, pero dicha experimentación no permite afirmar con rotundidad el mecanismo o los mecanismos implicados (ver Figura 4.57). Consultando la bibliografía disponible, se aprecia como el estudio de los mecanismos de la acción antifúngica del propóleo ha dado lugar a interpretaciones muy diversas, y de ninguna manera se puede dar por totalmente aclarado.

Ya se ha comentado anteriormente la riqueza del propóleo en moléculas antioxidantes, como los polifenoles. Igualmente, es abundante la literatura sobre sus efectos beneficiosos en el tratamiento y prevención de enfermedades relacionadas con la aparición de radicales libres y ROS (105,195,196). La idea más difundida sobre estos antioxidantes es que provocan una acción beneficiosa en el metabolismo celular aerobio al disminuir los efectos producidos por el estrés oxidativo. Sin embargo, algunos polifenoles muestran capacidad prooxidante, pudiendo tener efectos tóxicos por varios mecanismos. En este equilibrio entre acción antioxidante y prooxidante, el fraccionamiento y la consiguiente separación de componentes del propóleo podrían multiplicar el moderado efecto citotóxico que dicho propóleo muestra *per se*, potenciándose sinérgicamente al añadir otro antioxidante de distinta estructura química (diterpeno) y que no está presente en el propóleo; el ácido carnósico. Esta teoría se cumple perfectamente en la experimentación llevada a cabo en el presente trabajo.

Algunos autores indican que las propiedades antifúngicas de los componentes del propóleo se deben a los cambios que se producen en el contenido celular de enzimas antioxidantes y en la interferencia sobre la síntesis de ATP (197). También se ha señalado a los flavonoides por interferir en la acción de los transportadores ABC que forman parte de los transportadores de resistencia a multifármacos, uno de los mecanismos más importantes que usan las levaduras patógenas para eludir y vencer el tratamiento con agentes quimioterapéuticos. Dicha interferencia parece darse a nivel de reguladores transcripcionales en *C. albicans* (198).

La acción citotóxica podría estar mediada por una inhibición de las histonas desacetilasas, que son esenciales para el crecimiento celular. La inhibición de esta enzima por los polifenoles (flavonoides y ésteres de fenoles aromáticos de los propóleos) hace que la cromatina permanezca hiperacetilada, impidiendo que se complete el ciclo celular (199). Por otra parte, se ha descrito que el efecto citotóxico de las flavonas de la miel se produce

también por interferencias del ciclo y proliferación celular mediante la activación de las caspasas que disparan los mecanismos de apoptosis. Tanto los procesos de desacetilación como de apoptosis muestran similitudes en todas las células eucariotas, sean levaduras o animales (200).

Los efectos específicos de los flavonoides en levaduras han sido objeto de estudio como en el caso del crecimiento del micelio de *Cytospora personii* (201) concluyendo que las formas libres o agliconas son más tóxicas que las gliconas o glucósidos de los flavonoides. Además, también hay diferencias de toxicidad dentro de los diferentes tipos de flavonoides.

Otro posible mecanismo, en este caso indirecto, consiste en la potenciación de la acción citotóxica de otros agentes como en el caso del cis-platino, al disminuir los niveles de GSH por acción de los flavonoides. El GSH es uno de los principales agentes antioxidantes y detoxificantes de las células, y su eliminación es la causa de que se sensibilicen frente al cis-platino (202). Los flavonoides o el CA también pueden disminuir los niveles intracelulares de GSH mediante reacciones de tioconjugación con este tripéptido. Un mecanismo semejante, se ha descrito como la causa de la leucoderma producida por acción citotóxica del rododendrol (compuesto fenólico extraído del rododendro o azalea) en los melanocitos cutáneos (203).

Las propiedades y los efectos descritos para el CA son diversos (ver Apartado 1.3) y, como ocurre con el propóleo y sus componentes, contradictorios, no habiendo unanimidad al respecto. Como ya se ha mencionado, el CA posee propiedades antiinflamatorias, hecho relacionado al menos en parte con la reducción de la liberación de NO, PEG2 y TNF- α con los consiguientes efectos beneficiosos en organismos superiores. Además, parece suprimir la actividad kinasa Src/Syk, relacionada con la maduración de linfocitos B (204). En cualquier caso, el efecto del CA sobre la expresión génica es complejo, pero una de las propiedades más relevantes y objeto de numerosos estudios es la inducción del factor de transcripción Nrf2. Aunque dicho efecto no es específico del CA, (parece compartirlo con otros agentes bioactivos como el CAPE o el resveratrol) es un factor clave para proteger las células del daño oxidativo regulando la expresión de un conjunto de genes que codifican propiedades antioxidantes (205). Las proteínas antioxidantes que están implicadas son:

- NAD(P)H quinona oxidoreductasa (NQO1), elimina las posibles quinonas citotóxicas que puedan aparecer como producto del metabolismo celular.

- Glutamato-cisteína ligasa (GLC), enzima esencial en la síntesis de GSH, uno de los antioxidantes más importantes.
- Sulfiredoxina1 (SRXN1) y Tioeductasa 1 (TXNRD1), mantienen reducidas las peroxiredoxinas, protectoras frente a peróxidos y peroxinitritos.
- Glutación-S-transferasa (GST), familia de enzimas que catalizan la conjugación de GSH con diversos xenobióticos electrofílicos para excretarlos.
- Proteínas de resistencia a multidrogas (MDRPs), transportadoras que permiten expulsar compuestos nocivos para las células y son importantes en el metabolismo fúngico y su capacidad infectiva.

A pesar de que la inducción de Nrf2 en principio debe favorecer la supervivencia celular y aumentar su resistencia frente a situaciones de estrés, puede también tener efectos adversos, de modo que Nrf2 podría no comportarse siempre como un factor citoprotector (206,207). En este contexto, ya se han citado las propiedades beneficiosas del CA (ver Apartado 1.3) como su efecto antiproliferativo en células de cáncer de colon a través de la activación del metabolismo ROS y la alteración de varios genes involucrados en rutas de degradación oxidativa de metabolitos endógenos (208). Otro efecto positivo del CA es su potencial antimicrobiano ampliamente comentado en apartados previos (63,74,78), estando estos efectos posiblemente relacionados por la oxidación del CA a la quinona previa al carnosol, que puede originar una especie potencialmente tóxica para las células (209).

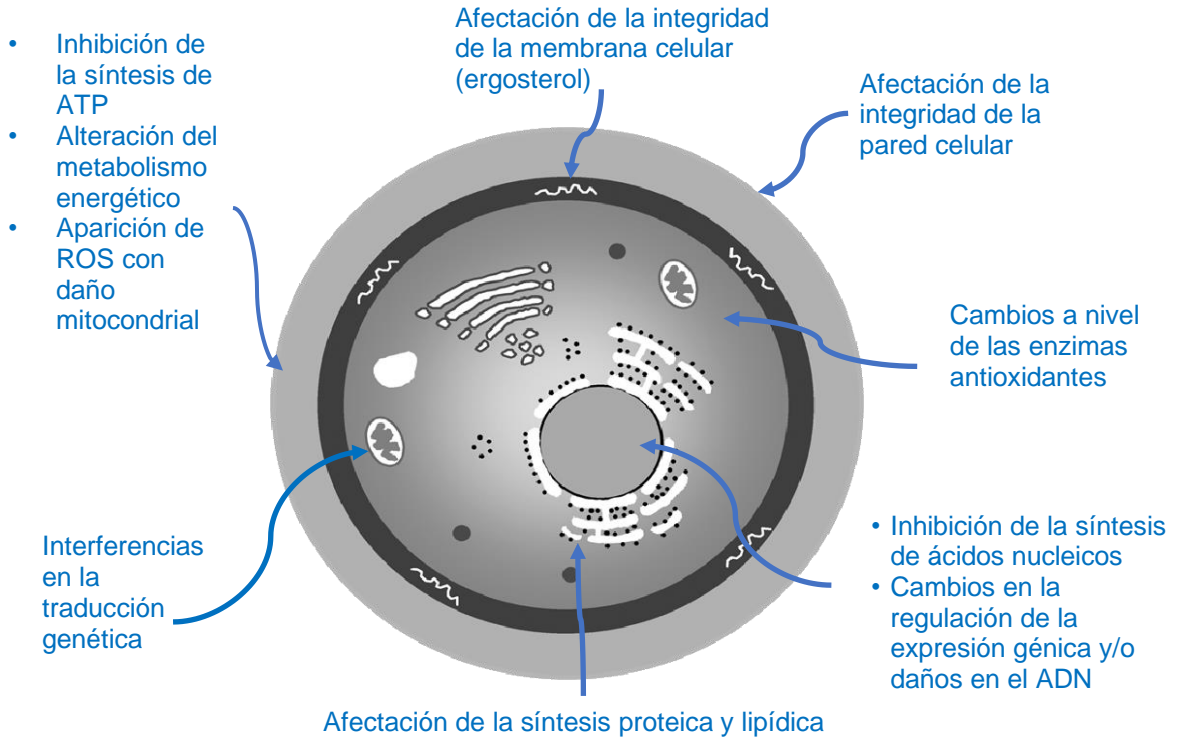


Figura 4.57. Imagen de una célula del reino Fungi donde se han señalado los orgánulos que podrían estar afectados por los posibles mecanismos de acción de CA+P3, detallados previamente.

4.5 Aplicaciones industriales de la combinación de P3 y CA: gel dental

Como ya se ha mencionado en varios apartados, la presente Tesis Doctoral tiene un marcado carácter industrial y de aplicación real de todo el conocimiento científico generado. Por ello, se diseñó y elaboró el prototipo de un producto que puede ser utilizado a nivel mundial y en rutina diaria, conteniendo los principios activos estudiados y descritos en los apartados anteriores y el efecto sinérgico que muestran en su actividad antifúngica: el propóleo y el ácido carnósico. Este prototipo, potencialmente utilizable de forma habitual, consistió en un gel dental, que además de ser efectivo frente a *C. albicans* y otros posibles hongos patógenos, tuviera en cuenta aspectos comerciales tales como la viabilidad económica e industrial, las propiedades organolépticas y reológicas para que fueran agradables al consumidor y la estabilidad con el paso del tiempo, dado que un producto de estas características suele tener una caducidad de 12 meses una vez abierto.

4.5.1 Ensayos de actividad y estabilidad *in vitro*

En una primera etapa se formularon distintos geles hasta conseguir una buena homogenización ya que los geles dentales no pueden ser anhidros y los extractos son preferencialmente hidrofóbicos. A continuación, se comparó la actividad antifúngica del gel con los principios activos frente al gel base que carecía de ellos, con la finalidad de asegurar que los efectos observados se debían solo a la presencia de dichos principios. Se calcularon las MICs de los principales excipientes utilizados en el gel definitivamente seleccionado, que denominamos M (resultados no mostrados) con el objetivo de descartar aquellos que pudieran tener cierta capacidad antifúngica, evitando así que los resultados pudieran verse afectados.

Seguidamente, se realizó un análisis preliminar de la actividad antimicrobiana del gel M en comparación con otros dentífricos comerciales. Para ello se empleó de nuevo la técnica de los antibiogramas, pues es una técnica rápida y sencilla para realizar ensayos rutinarios de cribado con distintos microorganismos. Además de *C. albicans*, se seleccionaron otros microorganismos que fueran potenciales patógenos orales, entre los que se encuentran *Candida parapsilosis* o las bacterias *Streptococcus mutans* y *Escherichia coli*. Cabe mencionar que la concentración de P3 y CA en el gel M fue del 2 y 1%, respectivamente,

pasando así de la ratio previa de $\frac{1}{4}$ en los ensayos *in vitro* a $\frac{1}{2}$, por motivos de aplicabilidad industrial, ya que el CA es más soluble en agua (Figura 4.58).

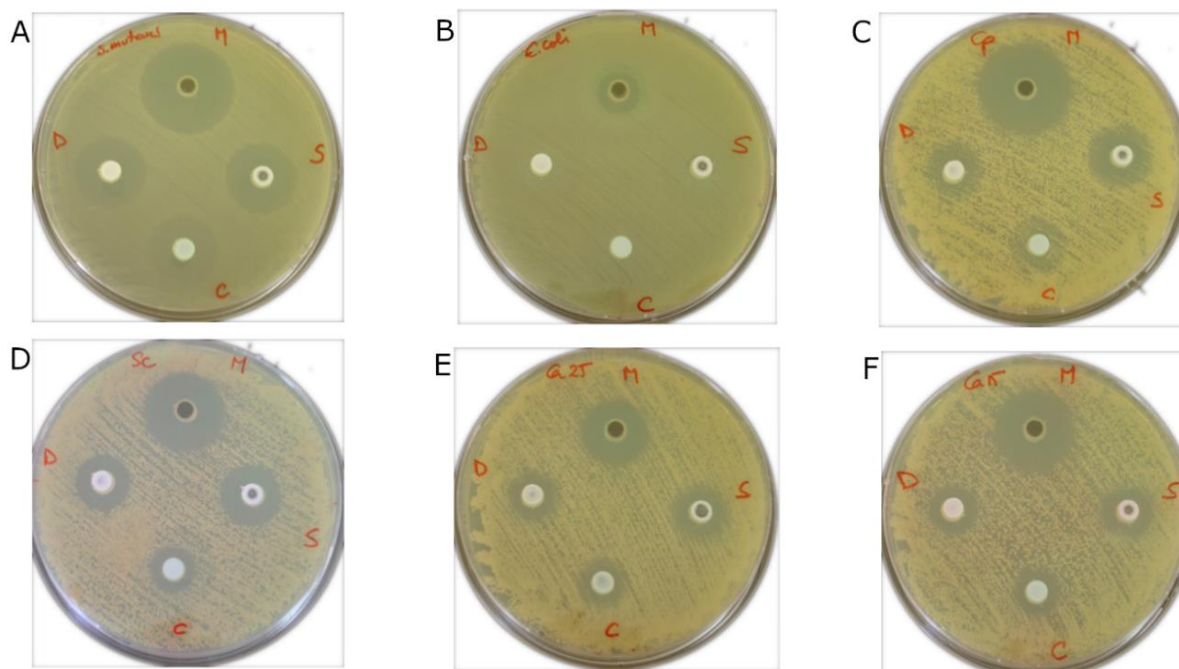


Figura 4.58. Antibiogramas de diferentes geles dentales. Los geles dentales comerciales fueron identificados como D, C y S, siendo M el gel dental elaborado con CA y P3. La cantidad de gel dispensada en los sacabocados fue de 25 μ l. Los microorganismos objeto de estudio fueron: A) *Streptococcus mutans*, B) *Escherichia coli*, C) *Candida parapsilosis*, D) *Candida albicans* cepa SC5314, E) *Candida albicans* cepa 025 procedente de un aislado.

En todos los casos el halo de inhibición producido por M es claramente muy superior al resto de geles. Incluso frente a *E. coli* el halo es apreciable, aunque de menor diámetro, siendo además el único gel dental eficaz con dicha bacteria Gram negativa. Es llamativa la diferencia de color entre M y los geles comerciales, debida a la coloración intrínseca de los principios activos.

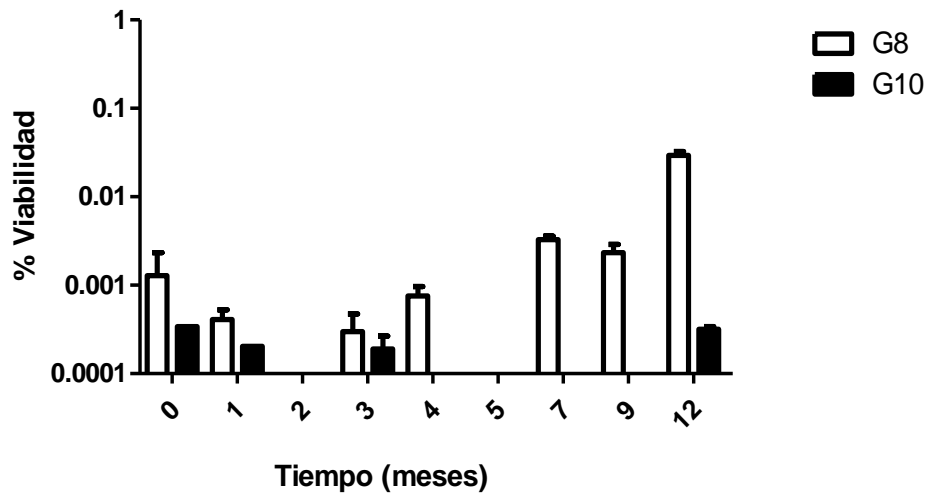
Tras comprobar que M era efectivo frente varios microorganismos, se formularon geles de composición similar, pero ajustando las concentraciones de algunos de los

componentes/excipientes para mejorar su apariencia y posible aceptación en el mercado. De todos esos geles, se eligieron por motivos de eficacia/coste económico los siguientes:

- Gel G8, G8A y G8B-V: 1% de CA y 2% de P3
- Gel G10 y G10B: 2% de CA y 4% de P3

En la Figura 4.59, se recogen los resultados de actividad frente a *C. albicans* (015) de los geles G8 y G10 con el paso del tiempo, y conservados a temperatura ambiente, comprobándose que son totalmente estables al no perder prácticamente su potencial antifúngico incluso transcurrido un año. Tan sólo en el caso del dentífrico con menor concentración de compuestos activos, se aprecia un ligero aumento de la viabilidad a partir de los 7 meses. En cuanto a los excipientes, recordar que carecen de actividad antifúngica en las dosis empleadas.

A



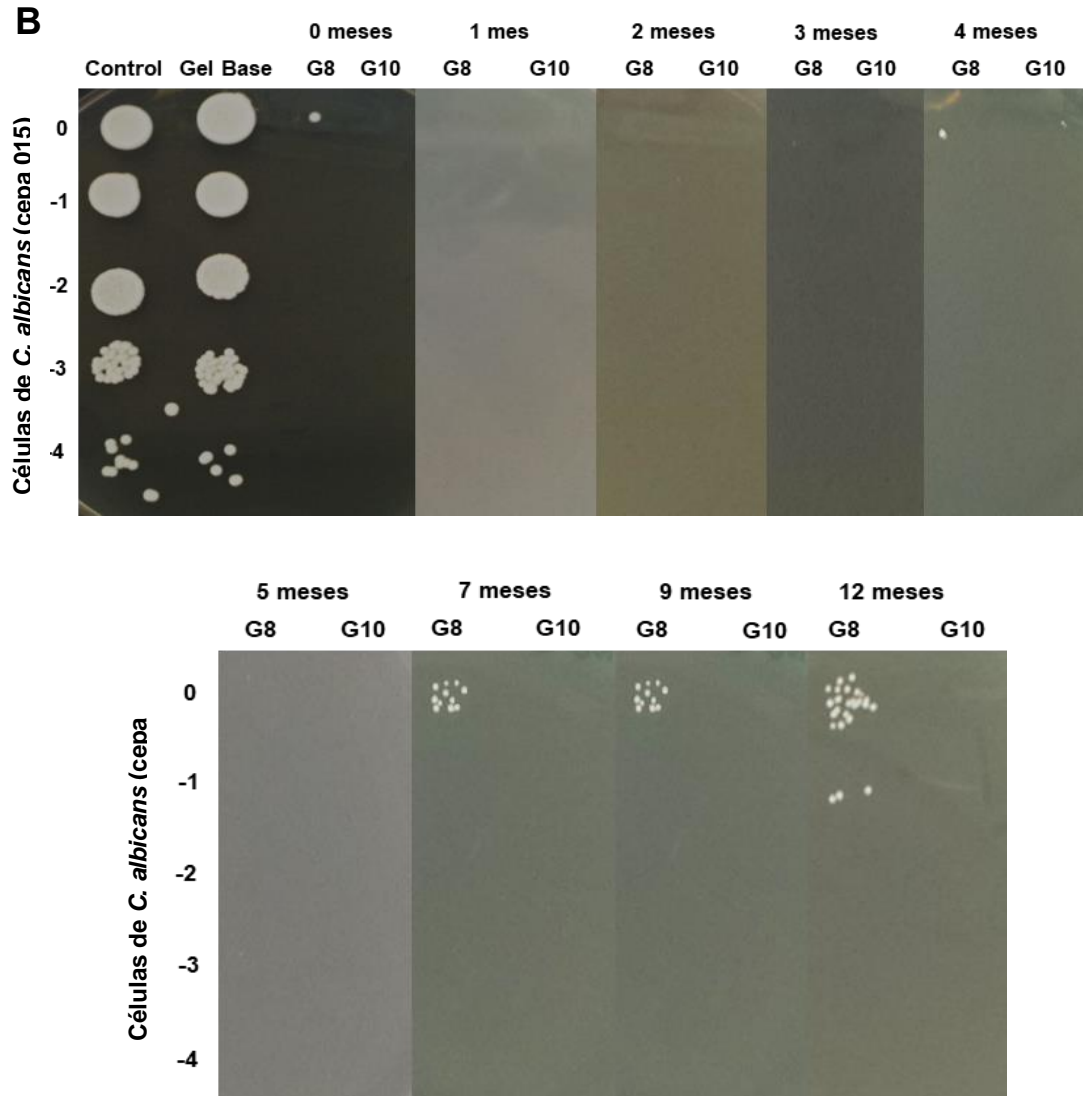


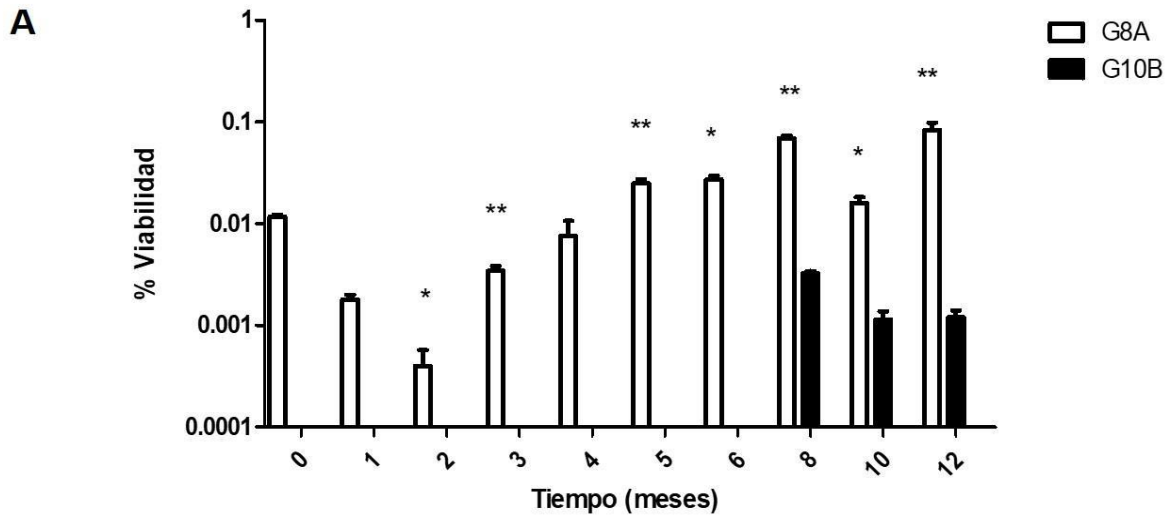
Figura 4.59. Ensayos de actividad antifúngica frente a la cepa 015 de *C. albicans* de los geles dentales G8 y G10 a lo largo del tiempo. A) Viabilidad (%). B) Fotografía del ensayo de formación de colonias macroscópicas en medio YPD sólido, utilizando las mismas alícuotas e incluyendo el Gel Base, que tiene la misma composición de excipientes que los otros dos, pero sin CA y P3.

La gran estabilidad de la eficacia antimicrobiana del gel con el paso del tiempo es una característica de vital importancia desde el punto de vista comercial por razones obvias, pero además parece indicar que la recuperación de la viabilidad celular observada en los experimentos cinéticos después de la exposición a una dosis determinada de la mezcla CA+P3 es probablemente debida a que son metabolizados por los patógenos, y son éstos

los que producen la degradación de los principios activos, y no debido a la inestabilidad química de éstos.

Dado que el Gel Base no presentó capacidad antifúngica, se decidió no incluirlo en más experimentos (Figura 4.59).

Los geles G8A y G10B, cuyos porcentajes de principios activos eran los mismos que sus predecesores, también fueron sometidos a los mismos ensayos de actividad. Los resultados se recogen en la Figura 4.60:



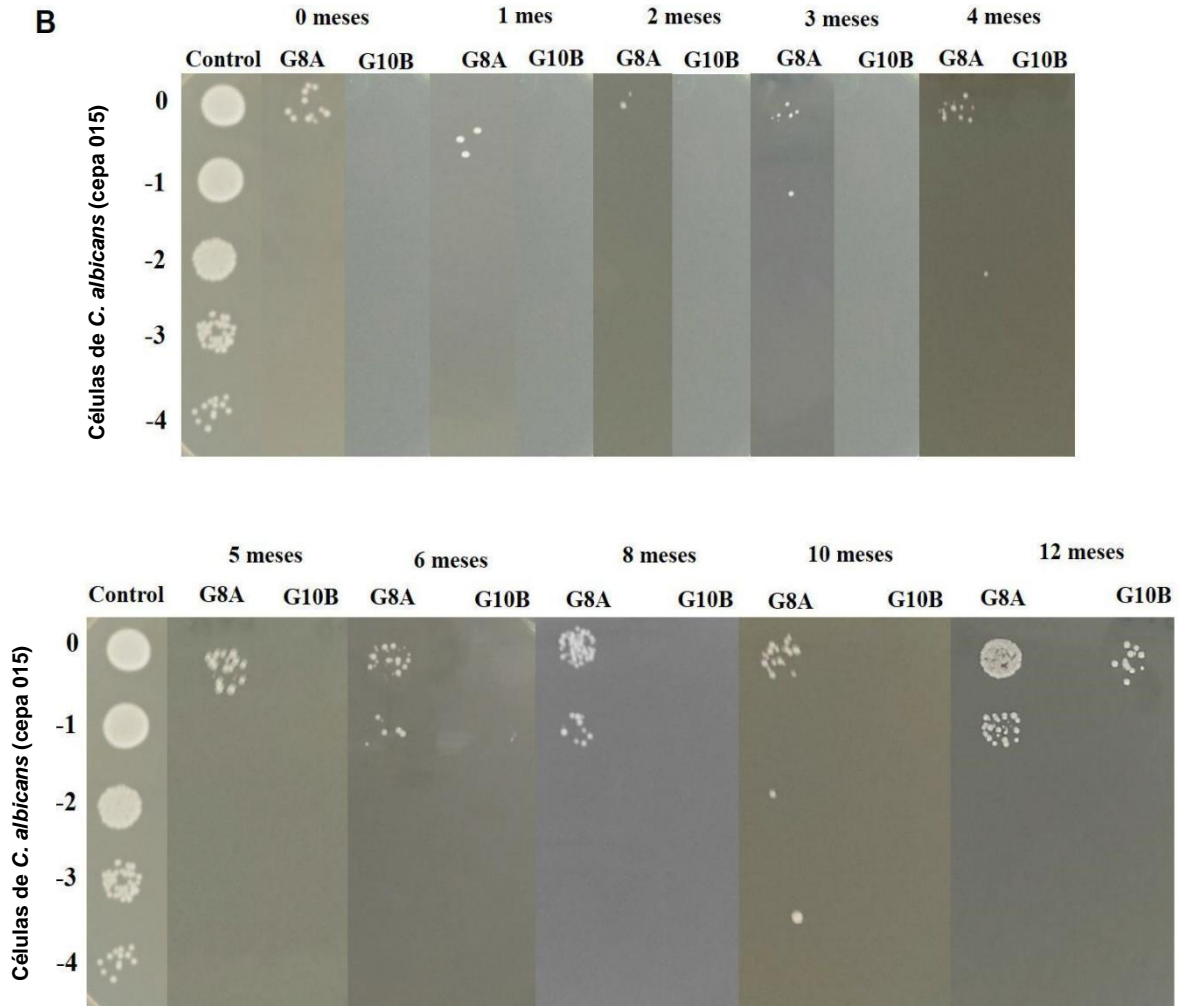


Figura 4.60. Ensayos de actividad antifúngica frente a la cepa 015 de *C. albicans* de los geles dentales G8A y G10B a lo largo del tiempo hasta cumplir un año de su fabricación. A) Viabilidad (%). B) Fotografía del ensayo de formación de colonias macroscópicas en medio YPD sólido.

En virtud de los excelentes resultados de estabilidad, capacidad antifúngica y relación coste/efecto, se decidió elegir G8 para ser utilizado en un ensayo de intervención en humanos, pero disminuyendo un poco la coloración debido a CA y P3 con el objetivo de que resultara más atractivo a los futuros usuarios. Para ello se adicionó más blanqueante. Este gel definitivo se denominó G8B-V y aunque los cambios fueron mínimos con respecto a su predecesor, su estabilidad también se estudió inicialmente durante 12 meses y se prolongó hasta los 3 años. Como se observa en la Figura 4.61, G8B-V es totalmente eficaz,

duradero y apto para utilizarse en un ensayo con humanos (para más información sobre toxicidad y seguridad de CA y P3 ver Apartado 4.5.2).

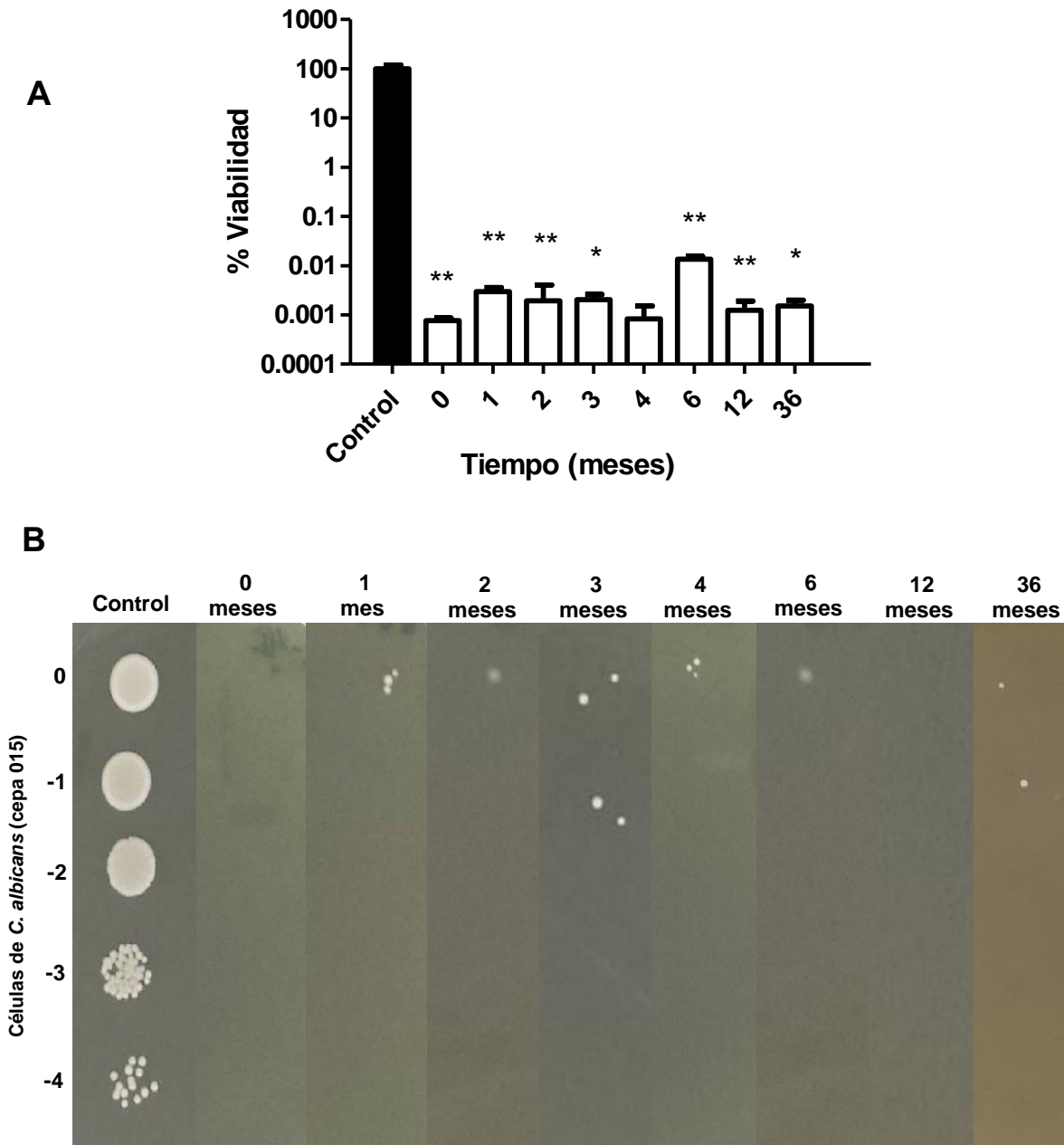


Figura 4.61. Ensayos de actividad antifúngica frente a la cepa 015 de *C. albicans* del gel dental G8B-V a lo largo del tiempo hasta cumplir tres años de su fabricación. A) Viabilidad (%). B) Fotografía del ensayo de formación de colonias macroscópicas en medio YPD sólido.

4.5.2 Ensayo de intervención biomédica en humanos con el gel dental

Como se ha comentado antes, G8B-V fue seleccionado por sus propiedades antifúngicas y reológicas, así como por tener un coste razonable. Se diseñó un ensayo de intervención biomédica con él sobre 21 pacientes para evaluar su capacidad para reducir la población de *C. albicans* en pacientes con infección bucal por dicho hongo.

La variable principal era el número de colonias de *C. albicans* formadas tras el análisis de la muestra de saliva obtenida en las visitas estipuladas tras el uso continuado de dicho gel. Esta variable se obtuvo a través del enfrentamiento del valor relativo obtenido mediante PCR-RT (TaqMan) y la concentración conocida procedente de un número determinado de unidades formadoras de colonias, siendo este último valor el control para la obtención del valor relativo anteriormente indicado.

El plan de trabajo consistió en una primera visita donde el paciente que potencialmente podía participar en el estudio fue informado al respecto, y en caso de dar su consentimiento, comprobar que cumplía con todos los criterios de inclusión y ninguno de los de exclusión. A continuación, se entregó la hoja de información al paciente y se tomó la primera muestra, la considerada como basal. Se anotaron los datos correspondientes a esta visita:

- Sexo
- Edad
- Frecuencia habitual del cepillado de dientes
- Utilización de inhaladores
- Diabetes
- Trasplante de órganos
- Xerostomía
- Utilización frecuente de antibióticos de amplio espectro
- Otros (relacionados con inmunosupresión)
- Estado bucal previo, como patología periodontal, patología de caries, presencia de prótesis removibles o fijas y observaciones clínicas relacionadas con la sospecha de candidiasis.

El procedimiento de obtención de las muestras de saliva se realizó mediante enjuague bucal durante 15 segundos con 15 ml de agua miliQ autoclavada en un tubo Falcon Estéril de 50 ml, que se cerró y almacenó en las condiciones adecuadas hasta su análisis correspondiente.

La siguiente visita se produjo como máximo a las 24h desde el primer cepillado con el gel dental y la siguiente a los 15 días. Adicionalmente, se estableció una visita fin de estudio a los 30 días para recoger datos clínicos sobre las observaciones relacionadas con la sospecha de infección por *Candida*, así como de seguridad en relación con el uso del gel dental.

Respecto al ámbito regulatorio, no existe problema alguno, ya que ambos ingredientes están definidos como productos “seguros” desde distintos puntos de vista:

- Ambos cuentan con el estatus de productos “food grade” (grado alimentario), tanto por sus especificaciones de producto (metales pesados, pesticidas, aflatoxinas, benzopirenos, disolventes residuales, características microbiológicas, etc.) como por su propio proceso de producción, que garantiza su condición de 100% natural (solo procedimientos físicos).
- Ambas materias primas vegetales, fuentes de los extractos obtenidos, son de amplio uso en la obtención de múltiples productos, utilizados en el sector de la alimentación incluso antes de 1997, momento en el que se genera el nuevo concepto de “novel food”.
- Incluso en el caso de los extractos de plantas labiadas, en general, éstos están considerados como aditivos tecnológicos regulados, tanto en alimentación humana como animal, con los consiguientes estudios de toxicología reconocidos y validados por las correspondientes autoridades europeas (EFSA).
- Como complemento, cabe mencionar que los estudios existentes sobre toxicidad aguda por ingesta de ambas familias de producto, extractos de plantas labiadas y propóleo, implican valores de LD50 muy superiores a 2000 mg/kg de peso y día. Destacan los estudios de toxicidad del CA mediante administración oral en ratones estableciéndose su LD50 en 7100 mg/kg (67).

Uno de los principales escollos para llevar a cabo un ensayo con pacientes, residía en la necesidad de cuantificar *C. albicans*. Para ello, el equipo de HM Hospitales diseñó y validaron una herramienta molecular, comenzando por escoger una pareja de *primers* universales dirigidos a secuencias específicas del género *Candida*, en las regiones ITS3 (localizada en la secuencia que codifica para el RNA ribosómico 5.8S) e ITS4 (localizada en la secuencia que codifica para el RNA ribosómico 28S). Además, se seleccionó una sonda específica de *C. albicans*, dirigida a una secuencia específica de la región ITS2 (Figura 4.62).

A PRIMERS:

Primers Universales descritos por **Fujita et al., 1995** (amplicón 300pb).

ITS3 (5.8S rDNA universal): 5'- GCA TCG ATG AAG AAC GCA GC-3'

ITS4 (28S rDNA universal): 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'

B SONDA TaqMan:

Sonda específica para *C. albicans* rediseñada y utilizada en **Shin et al., 1999**.

CA-FAM: 5'-FAM AT TGC TTG CGG CGG TAA CGT CC TAMRA-3'

C

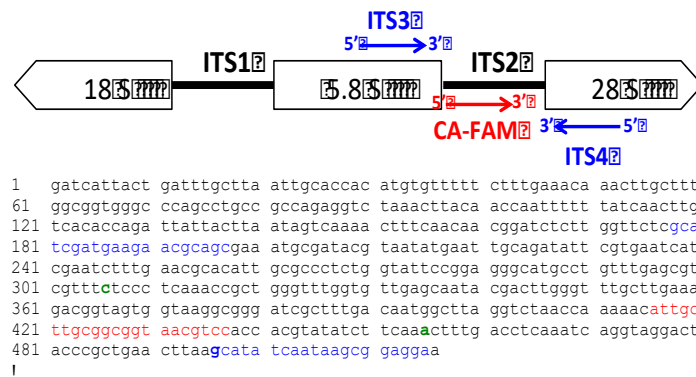
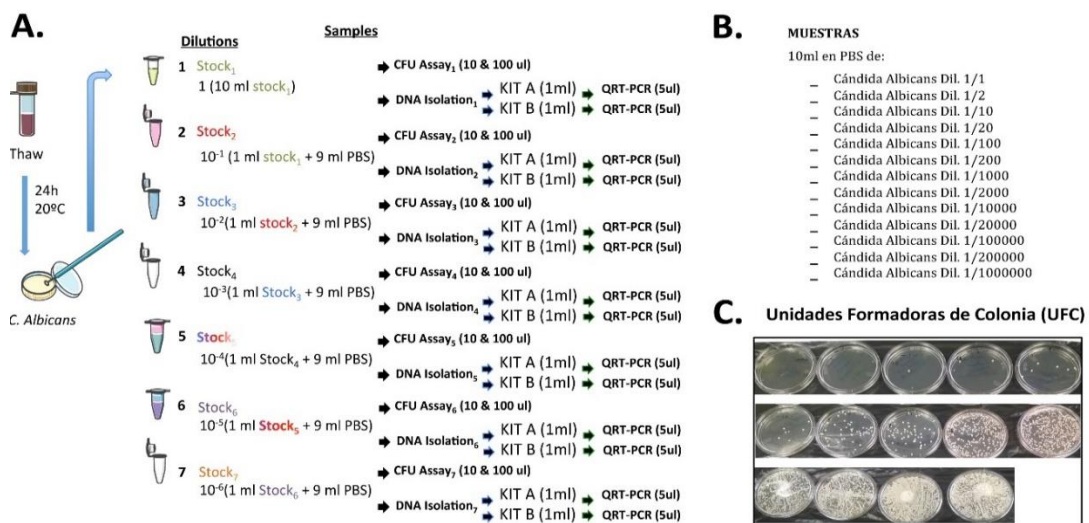


Figura 4.62. Herramientas moleculares para la detección específica de *C. albicans*. **A.** Primers universales para el género *Candida* que amplifican una región de aproximadamente 300pb (210). **B.**

Sonda TaqMan específica de *C. albicans* (211). **C.** Secuencia de DNA que codifica para RNA ribosómico en *C. albicans*.

Para poder establecer una correlación entre los valores de amplificación de DNA a tiempo real y las UFC (o CFU en inglés), se siguió el diseño experimental mostrado en la Figura 4.63A y que consistió, a grandes rasgos, en descongelar una muestra de *C. albicans*, sembrarla en agar con el medio correspondiente durante 24 horas, recoger una colonia y sembrarla en medio líquido O/N. A continuación, se realizaron diluciones seriadas pareadas (Figura 4.63B). Una de ellas se utilizó para aislar DNA total y la otra se sembró en agar (Figura 4.63C) y 24 horas después, se llevó a cabo un recuento de colonias en todos los cultivos en agar. Con respecto a la extracción de DNA total, primero se realizó un ensayo previo con el propósito de determinar el kit comercial más adecuado para el aislamiento de DNA total a partir de muestras de *C. albicans* disueltas en medio líquido. Para ello, se utilizaron 4 kits comerciales, que habían sido empleados previamente en el aislamiento de DNA total de *C. albicans* en la bibliografía. En el caso concreto del equipo de HM Hospitales, el kit con el que se obtuvieron mejores resultados fue “*Yeastar Genomic DNA kit Zymo Research*”, por lo que fue el designado para todos los análisis posteriores (Figura 4.63D). Seguidamente, se aisló el DNA total de las diluciones seriadas pareadas y se continuó con la amplificación de DNA específico de *C. albicans* mediante la utilización de la pareja de primers y sonda de la figura Figura 4.62. Los valores de Ct (umbral de ciclo, medición relativa de la concentración en la reacción PCR) obtenidos (Figura 4.63E) y las UFC de sus correspondientes muestras pareadas (Figura 4.63F), se obtuvo la recta patrón (Figura 4.63G) que correlaciona la cantidad total de DNA con las UFC, permitiendo estimar

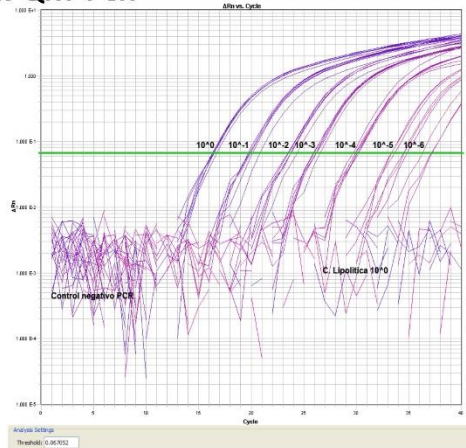


la cantidad de UFC de una muestra problema a partir de la interpolación de los valores de Ct de dicha muestra.

D.



E. QRT-PCR



F. Correlaciones con UFC

| Muestra | LOG | Media Exp. | UFC/ml |
|---------------------|-----|------------|----------|
| CA 10 ⁰ | 0 | 15,9537734 | 1,38E+06 |
| CA 10 ⁻¹ | -1 | 19,2687789 | 4,12E+05 |
| CA 10 ⁻² | -2 | 23,1711947 | 3,70E+04 |
| CA 10 ⁻³ | -3 | 25,3971472 | 2,90E+03 |
| CA 10 ⁻⁴ | -4 | 29,6346845 | 4,20E+02 |
| CA 10 ⁻⁵ | -5 | 33,1347283 | 2,00E+01 |
| CA 10 ⁻⁶ | -6 | 36,662028 | 0,00E+00 |
| Control - | | | |

G. Recta patrón

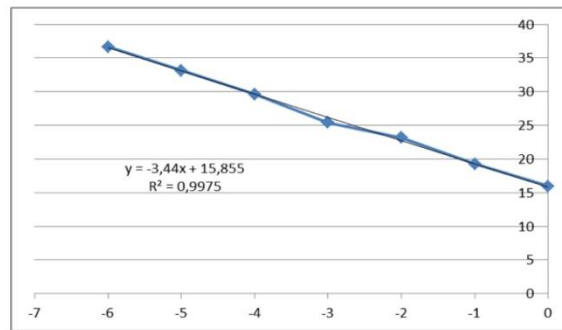


Figura 4.63. Validación de un método para correlacionar la cantidad de DNA total obtenido a partir de una muestra problema de *C. albicans* en medio líquido con UFC. **A.** Diseño experimental para la obtención de muestras seriadas pareadas de *C. albicans* en medio líquido. **B.** Diluciones seriadas pareadas. **C.** Colonias totales obtenidas en medio sólido a partir de las diluciones seriadas anteriores. **D.** Kit comercial seleccionado por sus resultados para obtener DNA de *Candida*. **E.** Valores de Ct obtenidos a partir del DNA aislado de las muestras seriadas pareadas, y amplificado con los primers y sonda de la Figura 4.62. **F.** Valores Ct y UFC de las muestras pareadas. **G.** Recta patrón que correlaciona los valores Ct y las UFC de las muestras pareadas.

Por motivos de confidencialidad no es posible revelar los resultados de dicho estudio de intervención biomédica, pero se puede afirmar de forma genérica que aproximadamente el 85% de los casos experimentaron una mejoría a nivel clínico y a nivel molecular el 60% de los pacientes tuvieron una respuesta positiva. Estos resultados pueden explicarse en parte porque entre los pacientes que no experimentaron mejoría están incluidos todos aquellos que podrían no haber seguido el protocolo correctamente que lo han hecho parcial o incorrectamente. Teniendo en cuenta que durante 15 días el paciente debía cepillarse tras las comidas principales del día con el gel dental y que además no podía tomar ninguna

sustancia considerada como medicamento, es posible que el número de pacientes que por un motivo u otro no siguiera estrictamente dicho protocolo sea considerable y explique en parte no haber obtenido un porcentaje de éxito mayor a nivel molecular hasta igualarlo con el clínico. Otro aspecto que cabe destacar es que el nivel basal de *Candida* en el ser humano es muy variable.

A título de ejemplo se muestran unas imágenes (Figura 4.64) de la evolución de uno de los pacientes tratados con dicho gel dental, donde se aprecia una notoria mejoría de los síntomas provocados por una severa candidiasis bucal, al reducirse de forma significativa y evidente la infección.

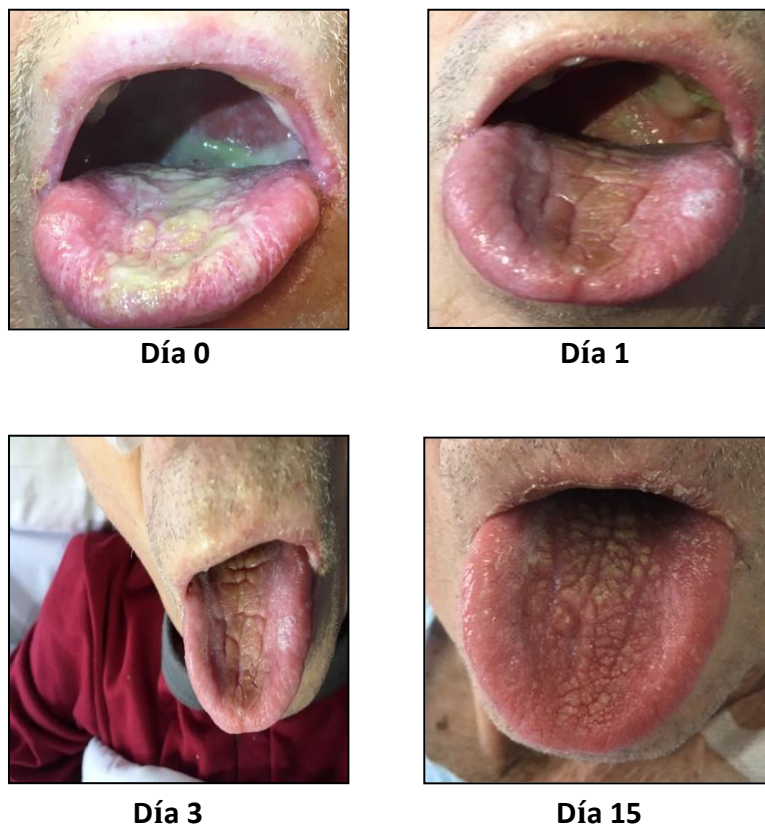


Figura 4.64. Paciente varón participante en el ensayo con linfoma gástrico a la espera de cirugía digestiva. Se observa como en el día 0 la presencia de *Candida* en la cavidad oral es clara. Al iniciarse el tratamiento, la mejoría es notable y ésta se mantiene a lo largo de todo el tratamiento (días 1, 3 y 15).

4.5.3 Estudio de viabilidad comercial

Desde el inicio de esta Tesis, se ha tenido en cuenta su vocación industrial, siendo tanto su viabilidad técnica a escala industrial como su rentabilidad económica pilares fundamentales.

La rentabilidad económica pasa, indefectiblemente, por desarrollar un producto efectivo y técnicamente viable a nivel industrial pero también es básico que su precio de venta al público sea suficientemente competente, lo que suele depender en gran medida de los competidores ya establecidos, del nicho de mercado y sus márgenes de beneficio y lógicamente del marketing llevado a cabo.

En cuanto a cifras de mercado, en 2014 la investigación y el desarrollo de un nuevo medicamento suponía un total de 2.425 millones de euros (2.558 millones de dólares), 13 veces más que en 1979. La inversión global de la industria farmacéutica en actividades de I+D fue de 142.000 millones de euros en 2016, 30.000 de ellos en Europa. Más de la mitad de esta inversión (el 57,6%) se destina al diseño, desarrollo y evaluación de ensayos clínicos (fases 1, 2 y 3). El resto, a investigación básica (24,8%), procesos de aprobación (6,1%) y tareas de farmacovigilancia (9,5%). El horizonte temporal para desarrollar y llevar al paciente un nuevo medicamento o vacuna está entre 12 y 13 años, requiriéndose unas 7 millones de horas de trabajo para obtener un fármaco seguro, efectivo y de alto valor clínico (212).

Todos estos puntos son importantes, pero contar con un precio de materia prima razonable y unos procesos industriales económicamente asequibles son dos aspectos que también han de ser factibles. Actualmente, el coste del propóleo y del ácido carnósico es asumible, aunque como es lógico, estas cotizaciones pueden variar. Además, al ser productos naturales, hechos circunstanciales como la climatología pueden influir tanto en las características de la materia prima como en su coste.

Hoy en día, no se venden preparaciones con mayores concentraciones de ácido carnósico que la empleada habitualmente en este trabajo (72%), por lo que por cuestiones de aplicabilidad práctica no se ha probado en esta Tesis otro extracto más enriquecido, ya

que el precio del antifúngico resultante sería prohibitivo. Como ejemplo, la estimación del precio de mercado de productos verdaderamente enriquecidos en ácido carnósico y con bajas cantidades de otros diterpenos oscila entre 200 y 800 €/kg. Las preparaciones con una riqueza superior al 90% en CA arrojan costes de producción que elevan el valor del precio anterior a más de 5.000 €/kg.

En cualquier caso y para profundizar en el estudio de los mecanismos que subyacen en el efecto sinérgico observado, se realizaron unos experimentos de viabilidad y de formación de colonias macroscópicas con un extracto de carnósico enriquecido en laboratorio al 92% (CA92) con las dos cepas de *C. albicans* (Figura 4.65 y Figura 4.66) en las concentraciones que se detallan en la Tabla 4.10.

Tabla 4.10. Indicación de las concentraciones de ácido carnósico empleado en los ensayos cuyos principales resultados se recogen en la Figura 4.65 y Figura 4.66: ácido carnósico utilizado habitualmente (CA), carnósico enriquecido al 92% (CA92 y CA92*) y los propóleos (P2 o P3).

| Referencia | Extracto de CA (µg/ml) | Extracto de propóleo (µg/ml) | CA (µg/ml) |
|------------|------------------------|------------------------------|------------|
| CA | 50 | 0 | 36 |
| CA92 | 50 | 0 | 46 |
| CA92* | 39(*) | 0 | 36 |
| CA + P2 | 50 | 200 | 36 |
| CA92 + P2 | 50 | 200 | 46 |
| CA92* + P2 | 39(*) | 200 | 36 |
| CA + P3 | 50 | 200 | 36 |
| CA92 + P3 | 50 | 200 | 46 |
| CA92* + P3 | 39(*) | 200 | 36 |

(*)Las concentraciones fueron elegidas bajo dos premisas; que el contenido final de ácido carnósico en el medio fuera idéntico independientemente de la riqueza del extracto (CA y CA92*) o bien que se emplearan las mismas concentraciones del extracto, aunque la concentración final de ácido carnósico fuera superior (CA92) a la habitual (CA).

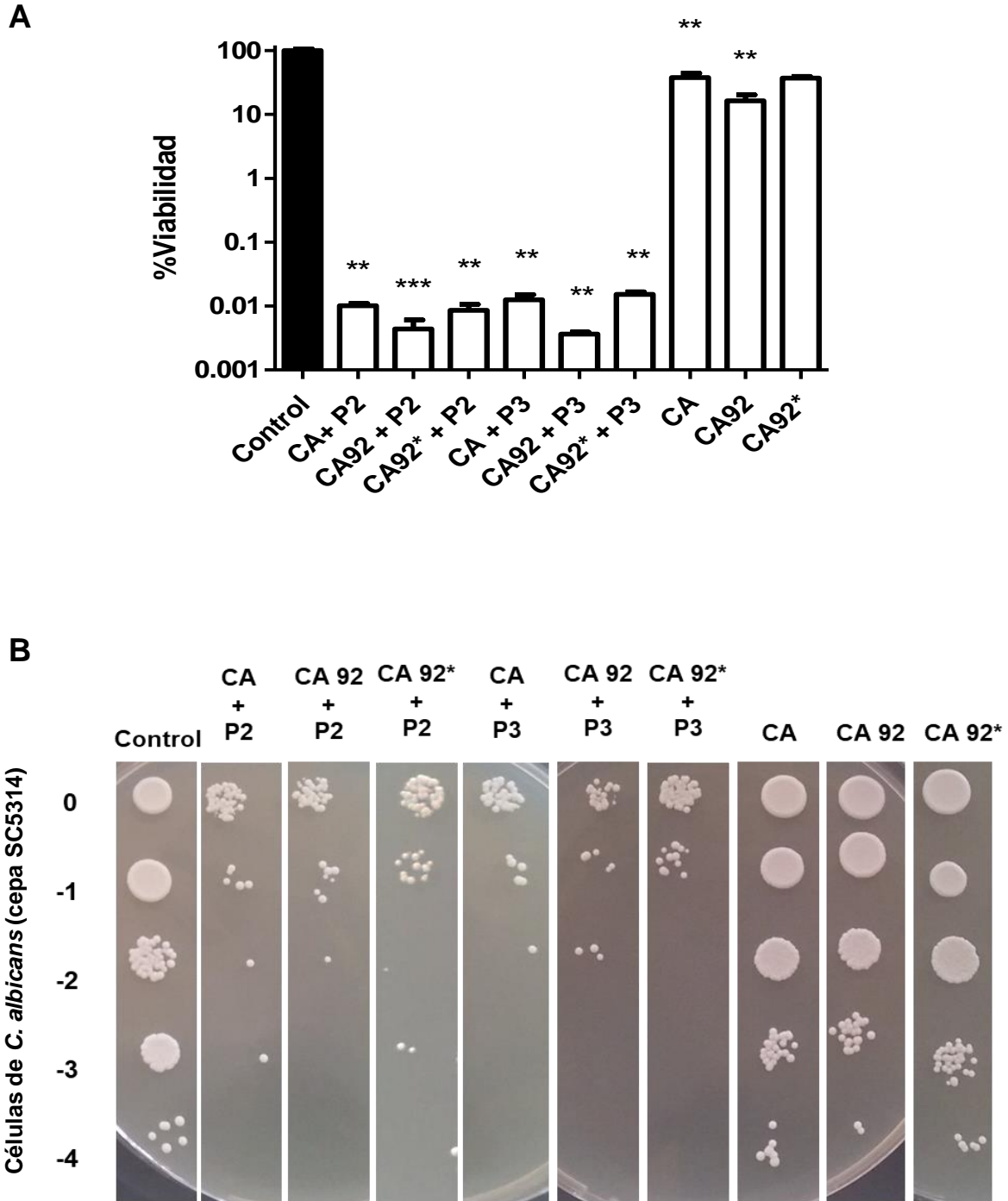
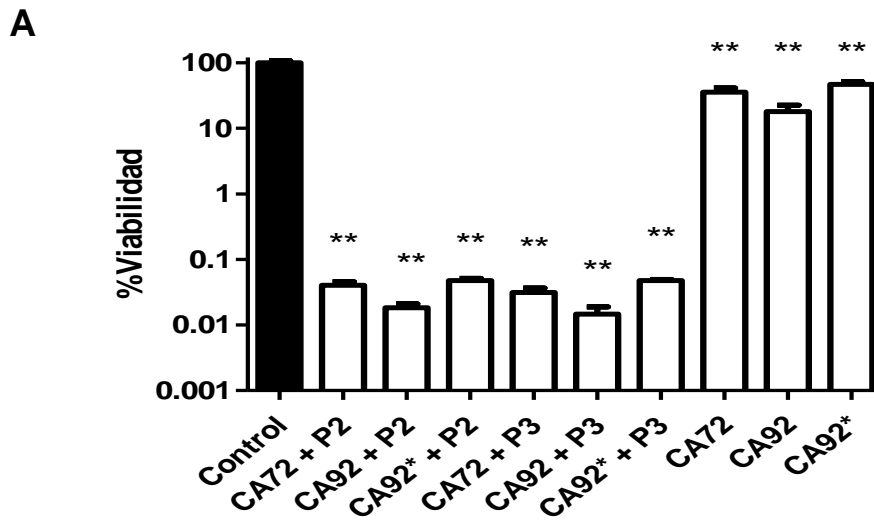


Figura 4.65. Ensayo de viabilidad de la cepa SC5314 (*C. albicans*) sometida a distintos tratamientos con extractos de romero y propóleo, cuyas concentraciones se especifican en la Tabla 4.10. A) Viabilidad (%). B) Fotografía del ensayo de formación de colonias macroscópicas en medio YPD sólido.

El aumento de la pureza del extracto de CA parece arrojar mejores resultados, pero no lo suficiente como para que el alto coste de dicha materia prima sea económicamente rentable desde el punto de vista industrial. Ningún extracto de ácido carnósico “*per se*” tiene capacidad *anticandida* suficiente como para ser considerado un antifúngico potencialmente efectivo.

Por otro lado, el sinergismo se produce en todos los casos; con los diferentes propóleos y extractos de ácido carnósico. Además, estos resultados son coherentes con el mayor poder antifúngico del P3 frente al P2, como ya se indicó inicialmente, así como con el contenido de CA.



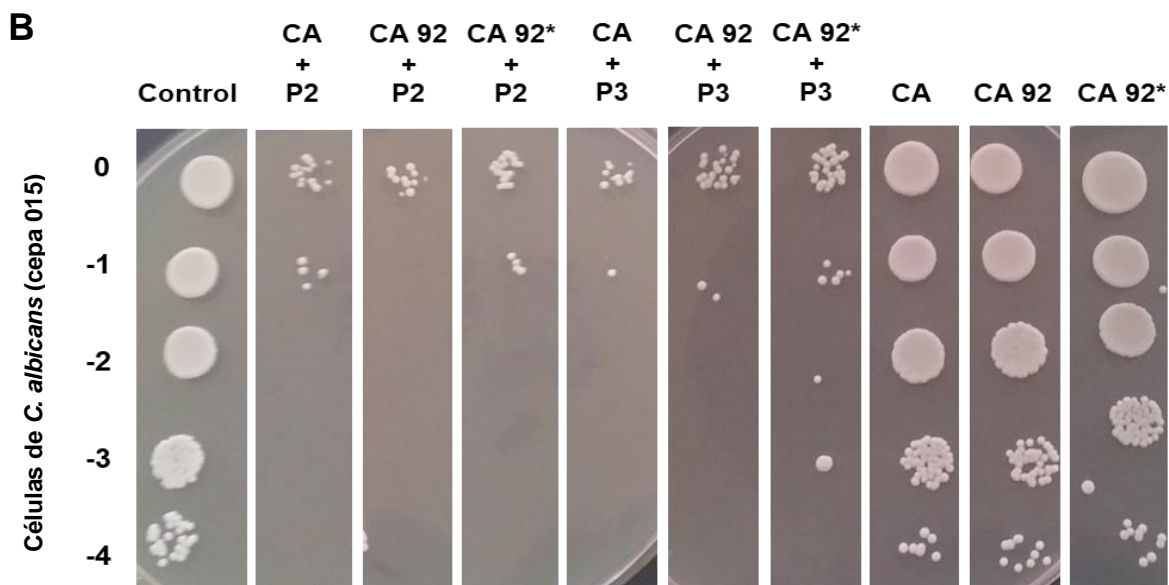


Figura 4.66. Ensayo de viabilidad análogo al de la Figura 4.65 pero utilizando la cepa 015 de *C. albicans*.

Las conclusiones que se obtienen con esta cepa son análogas a las anteriores, si bien, parece apreciarse una mayor sensibilidad al sinergismo y mayor resistencia a los extractos de ácido carnósico, pero ambas observaciones no son relevantes ni significativas.

Tomando cifras reales, en 2015, 7.262 moléculas se encontraban en fase de desarrollo, de las cuales sólo fueron autorizadas 44 nuevas medicinas, lo que refleja una tasa de éxito de alrededor del 0,6% en todos los procesos de I+D que emprende la industria farmacéutica. Desde el punto de vista económico cabe destacar que sólo 1 de cada 5 medicamentos comercializados generan ingresos que superan los costes medios de I+D (212). Por tanto, en esta coyuntura es fundamental que este nuevo antifúngico atraiga la atención de las empresas, para lo cual es imprescindible que el coste de sus materias primas y su producción industrial sea disponible en cantidad y asequible en carestía, además de tener una producción industrial factible. El compuesto Z proporcionado por Sigma-Aldrich utilizado en los ensayos descritos al inicio de este apartado tiene un precio excesivo por lo que se realizó una búsqueda comercial y se adquirieron diferentes extractos de comerciales de Z, con unos precios más razonables. Todos ellos se analizaron por HPLC. Los resultados se muestran en la Figura 4.67 para los 3 extractos comerciales adquiridos, y lamentablemente, mostraron muy poco contenido en Z. Concretamente, en el

mejor de los casos supone el 1,7% (Z(1)). El extracto denominado Z(3), sorprendentemente ninguno, a pesar de la indicación expresa del suministrador de la presencia del compuesto Z. Z(1) ya ha sido utilizado en el Apartado 4.3.12, y como era de esperar a juzgar por el bajo contenido en Z, no resultó ser eficaz.

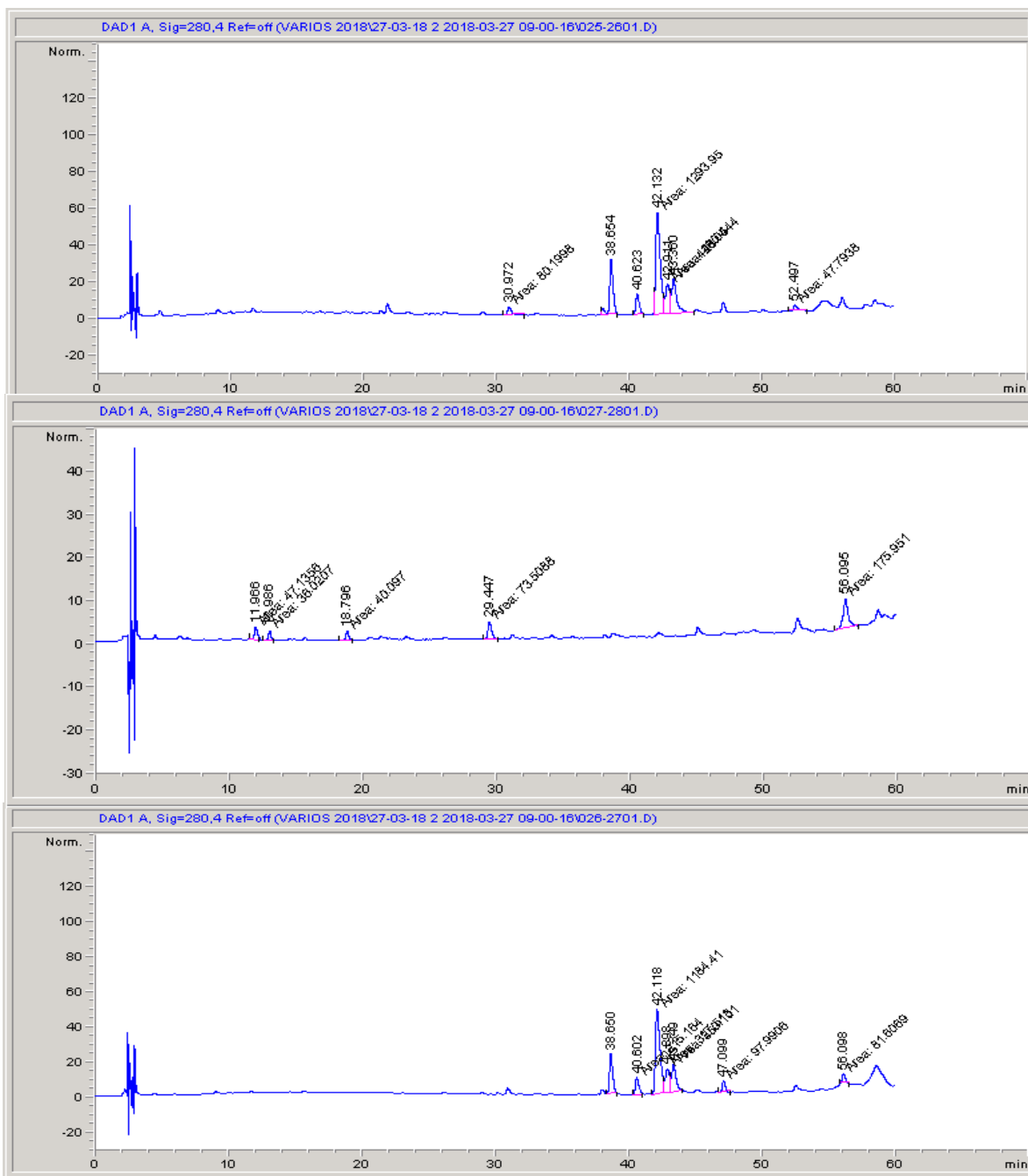


Figura 4.67. Cromatogramas (HPLC) de tres extractos comercializados con que contienen Z, y que se han denominado Z(1), Z(2) y Z(3) respectivamente. Se muestra el perfil de elución a 280 nm.

Por ello, el extracto Z(1) se concentró en el laboratorio con el objetivo de aumentar el contenido en Z todo lo posible, obteniéndose un extracto enriquecido denominado Z1*. El procedimiento forma parte del secreto industrial de la empresa, pero de forma muy somera se citan los procesos fisicoquímicos en el Apartado 3.2.12. Tras ello, se analizó el compuesto resultante por HPLC (Figura 4.68):

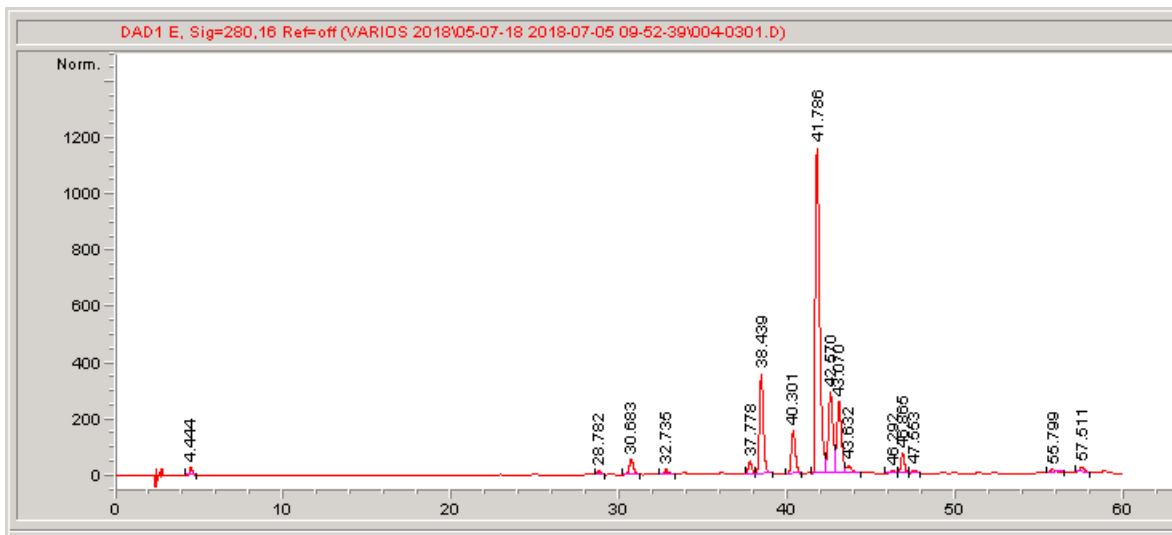
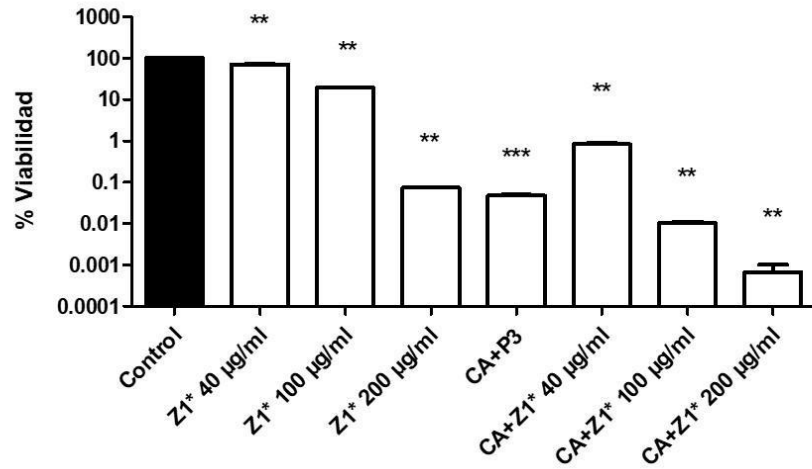


Figura 4.68. Cromatogramas (HPLC) de Z1* (extracto comercial de Z(1) enriquecido en el compuesto Z) a las longitudes de onda de 280 nm.

Mediante este cromatograma se cuantificó el contenido final en Z del extracto enriquecido Z1*, que resultó ser del 45%. Seguidamente, se llevaron a cabo experimentos de actividad antifúngica frente a la cepa 015 de *C. albicans* con él, cuyos resultados se muestran en la Figura 4.69:

A



B

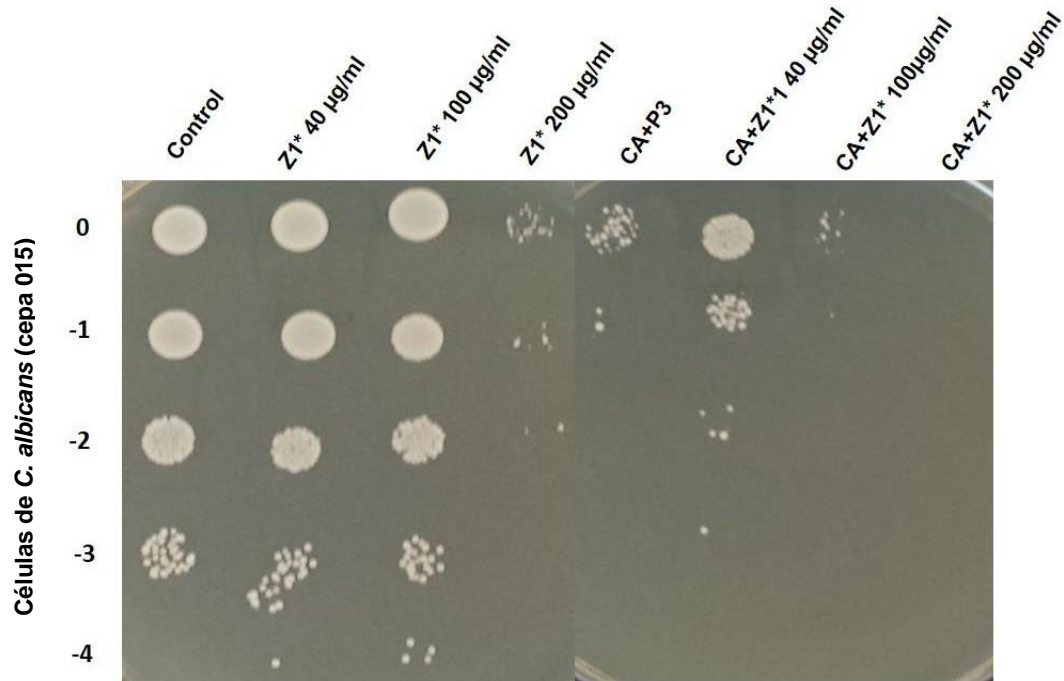


Figura 4.69. Ensayo de actividad antifúngica frente a la cepa 015 de *C. albicans* del compuesto Z1* a unas concentraciones de 40, 100 y 200 µg/ml combinado con CA (50 µg/ml). El tiempo de contacto de las células con los antifúngicos es de una hora. A) Viabilidad (%). B) Fotografía del ensayo de formación de colonias macroscópicas en medio YPD sólido que complementa al de viabilidad anterior, utilizando las mismas alícuotas.

La combinación de CA+Z1* a una concentración 50+40 µg/ml tiene un efecto limitado frente a *Candida*, pero al aumentar la dosis de Z1* (100 µg/ml) dicho efecto se incrementa considerablemente, por lo que podría considerarse una buena fuente de materia prima de Z a nivel industrial. No obstante, la reducción de la viabilidad con Z1* no es proporcional a la obtenida con Z de alta pureza (Sigma-Aldrich) a la misma concentración de compuesto activo en el medio, hecho que puede deberse a varios factores como la limitación del contacto del antifúngico con el hongo.

CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

1. El propóleo posee una actividad antifúngica limitada frente a diferentes hongos, siendo, en general, la del ácido carnósico superior.
2. La combinación de ciertos propóleos con un perfil cromatográfico similar al del P3 con CA es sinérgica y posee actividad antifúngica frente a cepas de diferente procedencia de *Candida albicans*, *Candida glabrata*, así como de *Cryptococcus neoformans*.
3. La eficacia de dicho sinergismo (CA+P3) si bien es notable en todos los casos, el grado varía en función de cada hongo, siendo más activa frente a *C. albicans* que frente a *C. neoformans*. El hongo más resistente de todos los estudiados parece ser *C. glabrata*.
4. En los experimentos de cinética de viabilidad celular, se observa la pervivencia de unas pocas células que podrían multiplicarse y dar lugar a la recuperación de dicha viabilidad. Aunque es difícil de justificar con los datos actuales, aunque este hecho puede ser debido a que la dosis empleada no sea suficiente para la eliminación total de todas las células, o bien a que exista una fracción celular que posea resistencia intrínseca (células persistentes). En *C. neoformans* no parece producirse este fenómeno o al menos no es tan significativo como en las especies de *Candida*.
5. Tanto las cepas parentales como las procedentes de aislados clínicos son sensibles a CA+P3 y las diferencias observadas entre ellas no parecen ser demasiado relevantes.
6. En general hay una buena correlación entre los ensayos de viabilidad en medio líquido y los de formación de colonias macroscópicas. Sin embargo, los experimentos para obtener las MICs no siempre siguen la misma tendencia que los mencionados anteriormente debido, muy probablemente, a las características intrínsecas de su protocolo. De hecho, las diferencias de capacidad antifúngica que se desprenden de experimentos de los ensayos de cálculo de las MICs y los ensayos de viabilidad apuntan en esta dirección, dado que los primeros se llevan a cabo tras 24 o 48 horas de contacto del microorganismo con los antifúngicos (según el protocolo específico de cada uno) y los últimos a 1 hora de forma habitual o a tiempos mayores en caso de estudios cinéticos. Por otro lado, los antibiogramas pueden servir para realizar ensayos preliminares, pero no son determinantes ni concluyentes.

7. Las micrograffías obtenidas están en consonancia con el resto de los experimentos llevados a cabo, al mostrar que la adición de los compuestos afecta a la morfología de la célula provocando un aumento de la granularidad y una reducción significativa del tamaño celular.
8. La identificación de los compuestos activos de P3 se inicia con la determinación de la fracción EtOH75 (eluida con una fase móvil 75% de etanol) como la más activa, tanto de forma individual como combinada con el CA. Al realizar una separación más exhaustiva, las subfracciones EtOH55 y EtOH60 son claramente señaladas y, para finalizar, el compuesto Z se perfila como el principio activo responsable de los efectos encontrados.
9. En conjunto, los resultados obtenidos evidencian, la existencia de una acción fungicida sinérgica inducida por la combinación de dos compuestos naturales, CA y P3. Además, respaldan la búsqueda continua de moléculas bioactivas más naturales, con el propósito de su aplicación en terapias clínicas contra *C. albicans* y posiblemente, contra otros hongos patógenos. Esta estrategia permitiría evitar los indeseables efectos secundarios nocivos provocados por algunos antifúngicos convencionales.
10. En relación a los mecanismos de actuación de CA+P3, se barajan varias hipótesis, pero ninguna es concluyente, por lo que son necesarias futuras investigaciones más profundas al respecto. Uno de los posibles mecanismos se basa en la capacidad pro-oxidante de algunos polifenoles, pudiendo provocar efectos tóxicos. De hecho, algunos investigadores han demostrado que el tratamiento con CA disminuye los niveles de GSH intracelular. Otro mecanismo, consiste en la potenciación de la acción citotóxica de otros agentes. La acción citotóxica (o al menos citoestática) podría estar mediada por una inhibición de las histonas desacetilasas, esenciales para el crecimiento celular. Otra opción que se contempla es que influyan en la activación de las caspasas, disparando mecanismos de apoptosis. Por último, se estima que el CA es capaz de inducción del factor de transcripción Nrf2. Por tanto, y a grandes rasgos, se puede indicar que tanto el CA como el P3 se han descrito como antioxidantes, con algunos efectos beneficiosos sobre las células animales debido a esta actividad y a su capacidad de eliminar ROS (56,155,213). Sin embargo, el equilibrio redox dentro de las células es complejo, y algunas investigaciones ponen en duda la creencia científica, ampliamente asumida, de que los agentes antioxidantes siempre son beneficiosos para las células vivas (214). Recientemente, algunos informes sugieren

que, en condiciones específicas, la presencia simultánea de dos antioxidantes podría dar lugar a una acción citotóxica opuesta debido a la inducción de un alto nivel de estrés oxidativo intracelular que afecta la función mitocondrial y el metabolismo aeróbico (215,216). Presumiblemente, la acción sinérgica aquí descrita estaría relacionada con ese deterioro intracelular del equilibrio antioxidante/pro-oxidante causado por ambos agentes. A este respecto, las quinona reductasas son enzimas cruciales en el mantenimiento del equilibrio redox celular, especialmente la quinona reductasa 2 (217).

11. La vehiculación de CA+P3 en un producto de amplio uso como es el gel dental, es totalmente satisfactoria, tanto por sus propiedades reológicas como por su actividad antifúngica, siendo ésta notablemente superior a los geles dentales comerciales utilizados habitualmente por la población. Además, cabe destacar su estabilidad con el transcurso del tiempo.
12. En un ensayo de intervención en humanos sometidos a tratamientos antitumorales y con evidencias de candidiasis bucal, se utilizó el gel dental mencionado anteriormente. El 85% de los pacientes experimentaron alguna mejoría clínica, y a nivel molecular el 60% tuvo una respuesta positiva. Por último, indicar que el 82% afirmó que utilizaría el gel fuera del estudio.

BIBLIOGRAFÍA

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Weinstein RA, Hota B. Contamination, Disinfection, and Cross-Colonization: Are Hospital Surfaces Reservoirs for Nosocomial Infection? *Clin Infect Dis*. 2004;39(8):1182–9.
2. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of Invasive Mycoses in North America. *Crit Rev Microbiol*. 2010;36(1):1–53.
3. Kreger-van Rij NJW. The yeasts: a taxonomic study. Elsevier Science Publishers; 1952. 713 p.
4. Bennett RJ. The parasexual lifestyle of *Candida albicans*. *Curr Opin Microbiol*. 2015;28:10–7.
5. Jabra-Rizk MA, Kong EF, Tsui C, Nguyen MH, Clancy CJ, Fidel PL, Noverr M. *Candida albicans* Pathogenesis: Fitting within the Host-Microbe Damage Response Framework. Maurelli AT, editor. *Infect Immun*. 2016;84(10):2724–39.
6. Tsui C, Kong EF, Jabra-Rizk MA. Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm. *Pathog Dis*. 2016;74(4).
7. González-Párraga P, Sánchez-Fresneda R, Zaragoza Ó, Argüelles JC. Amphotericin B induces trehalose synthesis and simultaneously activates an antioxidant enzymatic response in *Candida albicans*. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1810(8):777–83.
8. Sardi JCO, Giannini MJSM, Bernardi T, Scorzoni L, Fusco-Almeida AM. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *J Med Microbiol*. 2013;62(1):10–24.
9. Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*. 2013;4(2):119–28.
10. Pfaller MA, Castanheira M. Nosocomial Candidiasis: Antifungal Stewardship and the Importance of Rapid Diagnosis. *Med Mycol*. 2016;54(1):1–22.
11. Ortega M, Marco F, Soriano A, Almela M, Martínez JA, López J, Pitart C, Mensa J. *Candida* species bloodstream infection: epidemiology and outcome in a single institution from 1991 to 2008. *J Hosp Infect*. 2011;77(2):157–61.
12. Pfaller MA, Jones RN, Castanheira M. Regional data analysis of *Candida non-albicans* strains collected in United States medical sites over a 6-year period, 2006–2011. *Mycoses*. 2014;57(10):602–11.
13. Yapar N. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. *Ther Clin Risk Manag*. 2014;10:95–105.
14. Mascellino MT, Oliva A. Epidemiology of Candidaemia: A Prospective Comparison between Invasive Candidiasis in Italy and All Over the World. *J Clin Exp Pathol*. 2015;06(01).

15. Lockhart SR. Current Epidemiology of *Candida* Infection. Clin Microbiol Newsl. 2014;36(17):131–6.
16. Perlin DS, Shor E, Zhao Y. Update on Antifungal Drug Resistance. Curr Clin Microbiol Reports. 2015;2(2):84–95.
17. Ramos A, Romero Y, Sánchez-Romero I, Fortún J, Paño JR, Pemán J, Gurguí M, Rodríguez-Baño J, Padilla B. Risk factors, clinical presentation and prognosis of mixed candidaemia: a population-based surveillance in Spain. Mycoses. 2016;59(10):636–43.
18. Pemán J, Salavert M. Epidemiología general de la enfermedad fúngica invasora. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2012;30(2):90–8.
19. Antimicrobial resistance [Internet]. World Health Organization. 2018.
20. Friedman, Schwartz. Emerging fungal infections: new patients, new patterns, and new pathogens. J Fungi. 2019;5(3):67.
21. Quindós G. Epidemiology of invasive mycoses: A landscape in continuous change. Rev Iberoam Micol. 2018;35(4):171–8.
22. Quindós G, Marcos-Arias C, San-Millán R, Mateo E, Eraso E. The continuous changes in the aetiology and epidemiology of invasive candidiasis: from familiar *Candida albicans* to multiresistant *Candida auris*. Int Microbiol. 2018;21(3):107–19.
23. Currie BP, Casadevall A. Estimation of the prevalence of cryptococcal infection among patients infected with the human immunodeficiency virus in New York City. Clin Infect Dis. 1997;19(6):1029–33.
24. Perfect JR, Heitman J, Giles SS, Mitchell TG, Mylonakis E, Malliaris SD, KD, Nielsen K, Malliaris SD, Benjamin DK, Giles SS. *Cryptococcus neoformans* strains preferentially disseminate to the central nervous system during coinfection. Infect Immun. 2005;73(8):4922–33.
25. Currie B, Sanati H, Ibrahim AS, Edwards JE, Casadevall A, Ghannoum MA. Sterol compositions and susceptibilities to Amphotericin B of environmental *Cryptococcus neoformans* isolates are changed by murine passage. Antimicrob Agents Chemother. 1995;39(9):1934–7.
26. Aguirre K, Crowe J, Haas A, Smith J. Resistance to *Cryptococcus neoformans* infection in the absence of CD4+ T cells. Med Mycol. 42(1):15–25.
27. Casadevall A, Perfect JR. *Cryptococcus neoformans*. Infect Immun. 2005;73(8):4922–33.
28. Velagapudi R, Hsueh Y-P, Geunes-Boyer S, Wright JR, Heitman J. Spores as infectious propagules of *Cryptococcus neoformans*. Infect Immun. 2009;77(10):4345–55.
29. Hoang LMN, Maguire JA, Doyle P, Fyfe M, Roscoe DL. *Cryptococcus neoformans* infections at Vancouver Hospital and Health Sciences Centre (1997--2002): epidemiology, microbiology and histopathology. J Med Microbiol. 2004;53(9):935–40.

30. Byrnes EJ, Marr KA. The outbreak of *Cryptococcus gattii* in western North America: epidemiology and clinical issues. *Curr Infect Dis Rep*. 2011;13(3):256–61.
31. Galanis E, MacDougall L, Kidd S, Morshed M, *gattii* Working Group BCC, others. Epidemiology of *Cryptococcus gattii*, British Columbia, Canada, 1999-2007. *Emerg Infect Dis*. 2010;16(2):251.
32. Zaragoza O, Chrisman CJ, Castelli MV, Frases S, Cuenca-Estrella M, Rodríguez-Tudela JL, Casadevall A. Capsule enlargement in *Cryptococcus neoformans* confers resistance to oxidative stress suggesting a mechanism for intracellular survival. *Cell Microbiol*. 2008;10(10):2043–57.
33. Bernal-Martinez L, Gomez-Lopez A, Castelli MV, Mesa-Arango AC, Zaragoza O, Rodríguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. Susceptibility profile of clinical isolates of non-*Cryptococcus neoformans*/non-*Cryptococcus gattii* *Cryptococcus* species and literature review. *Med Mycol*. 2010;48(1):90–6.
34. Chottanapund S, Singhasivanon P, Kaewkungwal J, Chamroonswasdi K, Manosuthi W. Survival time of HIV-infected patients with cryptococcal meningitis. *Med J Med Assoc Thai*. 2007;90(10):2104.
35. Dannaoui E, Abdul M, Arpin M, Michel-Nguyen A, Piens MA, Favel A, Lortholary O, Dromer F, Group FCS, others. Results obtained with various antifungal susceptibility testing methods do not predict early clinical outcome in patients with cryptococcosis. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50(7):2464–70.
36. Friedman GD, Jeffrey Fessel W, Udaltsova NV, Hurley LB. Cryptococcosis: the 1981-2000 epidemic. *Mycoses*. 2005;48(2):122–5.
37. Jongwutiwes U, Kiertiburanakul S, Sungkanuparph S. Impact of antiretroviral therapy on the relapse of cryptococcosis and survival of HIV-infected patients with cryptococcal infection. *Curr HIV Res*. 2007;5(3):355–60.
38. Manosuthi W, Athichathanabadi C, Uttayamakul S, Phoorisri T, Sungkanuparph S. Plasma nevirapine levels, adverse events and efficacy of antiretroviral therapy among HIV-infected patients concurrently receiving nevirapine-based antiretroviral therapy and fluconazole. *BMC Infect Dis*. 2007;7(1):14.
39. Micol R, Lortholary O, Sar B, Laureillard D, Ngeth C, Dousset JP, Chanroeun H, Ferradini L, Guerin PJ, Dromer F, others. Prevalence, determinants of positivity, and clinical utility of cryptococcal antigenemia in Cambodian HIV-infected patients. *JAIDS J Acquir Immune Defic Syndr*. 2007;45(5):555–9.
40. Mirza SA, Phelan M, Rimland D, Graviss E, Hamill R, Brandt ME, Gardner T, Sattah M, De Leon GP, Baughman W, others. The changing epidemiology of cryptococcosis: an update from population-based active surveillance in 2 large metropolitan areas, 1992-2000. *Clin Infect Dis*. 2003;36(6):789–94.
41. Harris JR, Lindsley MD, Henchaichon S, Poonwan N, Naorat S, Prapasiri P, Chantra S, Ruamcharoen F, Chang LS, Chittaganpitch M, others. High prevalence of cryptococcal infection among HIV-infected patients hospitalized with pneumonia in Thailand. *Clin Infect Dis*. 2011;54(5):43–50.

42. Maubon D, Garnaud C, Calandra T, Sanglard D, Cornet M. Resistance of *Candida* spp. to antifungal drugs in the ICU: where are we now? *Intensive Care Med.* 2014;40(9):1241–55.
43. Ruiz-Camps I, Cuenca-Estrella M. Antifúngicos para uso sistémico. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2009;27(6):353–62.
44. Gray KC, Palacios DS, Dailey I, Endo MM, Uno BE, Wilcock BC, Burke MD. Amphotericin primarily kills yeast by simply binding ergosterol. *Proc Natl Acad Sci.* 2012;109(7):2234–9.
45. Ellis D. Amphotericin B: spectrum and resistance. *J Antimicrob Chemother.* 2002;49(suppl1):7–10.
46. Sanguinetti M, Posteraro B, Lass-Flörl C. Antifungal drug resistance among *Candida* species: mechanisms and clinical impact. *Mycoses.* 2015;58:2–13.
47. Vincent BM, Lancaster AK, Scherz-Shouval R, Whitesell L, Lindquist S. Fitness trade-offs restrict the evolution of resistance to Amphotericin B. *PLoS Biol.* 2013;11(10).
48. Klepser M. The value of Amphotericin B in the treatment of invasive fungal infections. *J Crit Care.* 2011;26(2):225.e1-225.e10.
49. Denning DW. Echinocandin antifungal drugs. *Lancet.* 2003;362(9390):1142–51.
50. Chen SC-A, Slavin MA, Sorrell TC. Echinocandin antifungal drugs in fungal infections. *Drugs.* 2011;71(1):11–41.
51. Arendrup MC, Perlin DS. Echinocandin resistance. *Curr Opin Infect Dis.* 2014;27(6):484–92.
52. PubChem [Internet].
53. Catalán M, Montejo JC. Antifúngicos sistémicos. Farmacodinamia y farmacocinética. *Rev Iberoam Micol.* 2006;23(1):39–49.
54. Ryan KJ, Ray CG, Ahmad N, Drew WL, Plorde JJ. Sherris. *Microbiología Médica.* 5th ed. Mc Graw Hill; 2011. 1–793 p.
55. Ribeiro-Santos R, Carvalho-Costa D, Cavaleiro C, Costa HS, Albuquerque TG, Castilho MC, Ramos F, Melo NR, Sanches-Silva A. A novel insight on an ancient aromatic plant: The Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Trends Food Sci Technol.* 2015;45(2):355–68.
56. Badiee P, Reza Nasirzadeh A, Motaffaf M, Nasirzadeh R, Motaffaf M. Comparison of *Salvia officinalis* L. essential oil and antifungal agents against *Candida* species. *J Pharm Technol Drug Res.* 2012;1(1):1–5.
57. Weckesser S, Engel K, Simon-Haarhaus B, Wittmer A, Pelz K, Schempp CM. Screening of plant extracts for antimicrobial activity against bacteria and yeasts with dermatological relevance. *Phytomedicine.* 2007;14(7–8):508–16.
58. Moreno S, Scheyer T, Romano CS, Vojnov AA. Antioxidant and antimicrobial activities of Rosemary extracts linked to their polyphenol composition. *Free Radic*

- Res. 2006;40(2):223–31.
59. White AI, Jenkins GL. *Salvia carnososa* (doubl.). I—A phytochemical study. *J Pharm Sci.* 1942;31(2):33–7.
 60. Wenkert E, Fuchs A, McChesney JD. Chemical artifacts from the family *Labiatae*. *J Org Chem.* 1965;30(9):2931–4.
 61. Wellwood CRL, Cole RA. Relevance of carnosic acid concentrations to the selection of Rosemary, *Rosmarinus officinalis* (L.), accessions for optimization of antioxidant yield. *J Agric Food Chem.* 2004;52(20):6101–7.
 62. Tounekti T, Munné-Bosch S. Enhanced phenolic diterpenes antioxidant levels through non-transgenic approaches. *CRC Crit Rev Plant Sci.* 2012;31(6):505–19.
 63. Birtić S, Dussort P, Pierre F-X, Bily AC, Roller M. Carnosic acid. *Phytochemistry.* 2015;115:9–19.
 64. Oh J, Yu T, Choi SJ, Yang Y, Baek HS, An SA, Kwon LK, Kim J, Rho HS, Shin SS, Choi WS, Hong S, Cho JY. Syk/Src Pathway-Targeted Inhibition of Skin Inflammatory Responses by Carnosic Acid. *Mediators Inflamm.* 2012;2012:1–13.
 65. Del Baño M, Benavente-Garcia O, Marin PM, Marin AM, Castillo J. The carnosic acid oxidation pathway: its influence on food processes. *Nutrafoods.* 2006;5:41–8.
 66. Kerkoub N, Panda SK, Yang M-R, Lu J-G, Jiang Z-H, Nasri H, Luyten W. Bioassay-guided isolation of anti-*Candida* biofilm compounds from methanol extracts of the aerial parts of *Salvia officinalis* (Annaba, Algeria). *Front Pharmacol.* 2018;9:1–12.
 67. Wang QL, Li H, Li XX, Cui CY, Wang R, Yu NX, Chen LX. Acute and 30-day oral toxicity studies of administered carnosic acid. *Food Chem Toxicol.* 2012;50(12):4348–55.
 68. Erkan N, Ayranci G, Ayranci E. Antioxidant activities of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. *Food Chem.* 2008;110(1):76–82.
 69. Munne-Bosch S. Drought-induced changes in the redox state of α -tocopherol, ascorbate, and the diterpene carnosic acid in chloroplasts of *Labiatae* species differing in carnosic acid contents. *Plant Physiol.* 2003;131(4):1816–25.
 70. Wang W, Wu N, Zu YG, Fu YJ. Antioxidative activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to its main components. *Food Chem.* 2008;108(3):1019–22.
 71. Zheng W, Wang SY. Antioxidant Activity and Phenolic Compounds in Selected Herbs. *J Agric Food Chem.* 2001;49(11):5165–70.
 72. Inatani R, Nakatani N, Fuwa H. Antioxidative effect of the constituents of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and their derivatives. *Agric Biol Chem.* 1983;47(March 2015):521–8.
 73. Zhang Y, Yang L, Zu Y, Chen X, Wang F, Liu F. Oxidative stability of sunflower oil supplemented with carnosic acid compared with synthetic antioxidants during

- accelerated storage. *Food Chem.* 2010;118(3):656–62.
74. Bernardes WA, Lucarini R, Tozatti MG, Souza MGM, Andrade Silva ML, da Silva Filho AA, Martins CHG, Miller Crotti AE, Pauletti PM, Groppo M. Antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* against oral pathogens: relevance of carnosic acid and carnosol. *Chem Biodivers.* 2010;7(7):1835–40.
 75. Ojeda-Sana AM, Repetto V, Moreno S. Carnosic acid is an efflux pumps modulator by dissipation of the membrane potential in *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus*. *World J Microbiol Biotechnol.* 2012;29(1):137–44.
 76. Oluwatuyi M, Kaatz GW, Gibbons S. Antibacterial and resistance modifying activity of *Rosmarinus officinalis*. *Phytochemistry.* 2004;65(24):3249–54.
 77. Bernardes W, Lucarini R, Tozatti M, Flauzino L, Souza M, Turatti I, Andradee Silva M, Martins C, da Silva Filho A, Cunha W. Antibacterial activity of the essential oil from *Rosmarinus officinalis* and its major components against oral pathogens. *Zeitschrift für Naturforsch C.* 2010;65(9–10):588–93.
 78. Jordán MJ, Lax V, Rota MC, Lorán S, Sotomayor JA. Relevance of carnosic acid, carnosol, and rosmarinic acid concentrations in the *in vitro* antioxidant and antimicrobial activities of *Rosmarinus officinalis* (L.) methanolic extracts. *J Agric Food Chem.* 2012;60(38):9603–8.
 79. Aruoma OI, Spencer JPE, Rossi R, Aeschbach R, Khan A, Mahmood N, Munoz A, Murcia A, Butler J, Halliwell B. An evaluation of the antioxidant and antiviral action of extracts of Rosemary and provençal herbs. *Food Chem Toxicol.* 1996;34(5):449–56.
 80. Borrás-Linares I, Pérez-Sánchez A, Lozano-Sánchez J, Barrajón-Catalán E, Arráez-Román D, Cifuentes A, Micol V, Carretero AS. A bioguided identification of the active compounds that contribute to the antiproliferative/cytotoxic effects of Rosemary extract on colon cancer cells. *Food Chem Toxicol.* 2015;80:215–22.
 81. Valdés A, Artemenko KA, Bergquist J, García-Cañas V, Cifuentes A. Comprehensive Proteomic Study of the Antiproliferative Activity of a Polyphenol-Enriched Rosemary Extract on Colon Cancer Cells Using Nanoliquid Chromatography Orbitrap MS/MS. *J Proteome Res.* 2016;15(6):1971–85.
 82. Dörrie J, Sapala K, Zunino SJ. Carnosol-induced apoptosis and downregulation of Bcl-2 in B-lineage leukemia cells. *Cancer Lett.* 2001;170(1):33–9.
 83. Manoharan S, VasanthaSelvan M, Silvan S, Baskaran N, Singh AK, Kumar VV. Carnosic acid: A potent chemopreventive agent against oral carcinogenesis. *Chem Biol Interact.* 2010;188(3):616–22.
 84. Poeckel D, Greiner C, Verhoff M, Rau O, Tausch L, Hörnig C, Steinhilber D, Schubert-Zsilavec M, Werz O. Carnosic acid and carnosol potently inhibit human 5-lipoxygenase and suppress pro-inflammatory responses of stimulated human polymorphonuclear leukocytes. *Biochem Pharmacol.* 2008;76(1):91–7.
 85. Johnson JJ. Carnosol: a promising anti-cancer and anti-inflammatory agent. *Cancer Lett.* 2011;305(1):1–7.

86. Sánchez-Campillo M, Gabaldon JA, Castillo J, Benavente-García O, Baño MJ Del, Alcaraz M, Vicente V, Alvarez N, Lozano JA. Rosmarinic acid, a photo-protective agent against UV and other ionizing radiations. *Food Chem Toxicol.* 2009;47(2):386–92.
87. Pérez-Sánchez A, Barraión-Catalán E, Caturla N, Castillo J, Benavente-García O, Alcaraz M, Micol V. Protective effects of citrus and Rosemary extracts on UV-induced damage in skin cell model and human volunteers. *J Photochem Photobiol B Biol.* 2014;136:12–8.
88. Del Baño MJ, Castillo J, Benavente-García O, Lorente J, Martín-Gil R, Acevedo C, Alcaraz M. Radioprotective–antimutagenic effects of Rosemary phenolics against chromosomal damage induced in human lymphocytes by γ -rays. *J Agric Food Chem.* 2006;54(6):2064–8.
89. Alcaraz M, Acevedo C, Castillo J, Benavente-Garcia O, Armero D, Vicente V, Canteras M. Liposoluble antioxidants provide an effective radioprotective barrier. *82(979):605–9.*
90. Ghisalberti EL. Propolis: a review. *Bee world.* 1979;60(2):59–84.
91. Siheri W, Alenezi S, Tusiimire J, Watson DG. The chemical and biological properties of propolis. In: *Bee Products - Chemical and Biological Properties.* 2017. p. 137–78.
92. Miguel MG, Antunes MD. Is propolis safe as an alternative medicine? *J Pharm Bioallied Sci.* 2011;3(4):479.
93. Bankova VS, de Castro SL, Marcucci MC. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie.* 2000;31(1):3–15.
94. Suleman T, van Vuuren S, Sandasi M, Viljoen AM. Antimicrobial activity and chemometric modelling of South African propolis. *J Appl Microbiol.* 2015;119(4):981–90.
95. Bogdanov S, Bankova V. *The Propolis Book.* Bee Hexag. 2012;
96. Fokt H, Pereira A, Ferreira AM, Cunha A, Aguiar C. How do bees prevent hive infections? The antimicrobial properties of propolis. *Appl Microbiol.* 2010;1:481–93.
97. Bankova V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *J Ethnopharmacol.* 2005;100(1–2):114–7.
98. Gómez-Caravaca AM, Gómez-Romero M, Arráez-Román D, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A. Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *J Pharm Biomed Anal.* 2006;41(4):1220–34.
99. Hegazi AG, Abd FK, Hadyb E, Abd Allah FAM. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of European Propolis. *Z Naturforsch.* 2000;55:70–5.
100. Huang S, Zhang C-P, Wang K, Li GQ, Hu F-L. Recent Advances in the Chemical Composition of Propolis. *Molecules.* 2014;19(12):19610–32.
101. Uzel A, Sorkun K, Önçağ Ö, Çoğulu D, Gençay Ö, Salih B. Chemical compositions

- and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. *Microbiol Res.* 2005;160(2):189–95.
102. Scazzocchio F, D'auria FD, Alessandrini D, Pantanella F. Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. *Microbiol Res.* 2006;161(4):327–33.
 103. Hegde KS, Bhat SS, Rao A, Sain S. Effect of propolis on *Streptococcus mutans* counts: An *in vivo* study. *Int J Clin Pediatr Dent.* 2013;6(1):22.
 104. Miguel MG, Antunes MD. Is propolis safe as an alternative medicine? *J Pharm Bioallied Sci.* 2011;3(4):479.
 105. Ahn MR, Kumazawa S, Hamasaka T, Bang KS, Nakayama T. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of Korea. *J Agric Food Chem.* 2004;52(24):7286–92.
 106. Hamasaka T, Kumazawa S, Fujimoto T, Nakayama T. Antioxidant Activity and Constituents of Propolis Collected in Various Areas of Japan. *Food Sci Technol Res.* 2004;10(1):86–92.
 107. Isidorov VA, Bakier S, Piroznikow E, Zambrzycka M, Swiecicka I. Selective behaviour of honeybees in acquiring European propolis plant precursors. *J Chem Ecol.* 2016;42(6):475–85.
 108. Kosalec I, Bakmaz M, Pepeljnjak S. Analysis of propolis from continental and Adriatic region of Croatia. *ACTA Pharm.* 2003;53(4):275–86.
 109. Freires IA, Queiroz VCPP, Furletti VF, Ikegaki M, de Alencar SM, Duarte MCT, Rosalen PL. Chemical composition and antifungal potential of Brazilian propolis against *Candida* spp. *J Mycol Med.* 2016;26(2):122–32.
 110. Kujumgiev A, Tsvetkova I, Serkedjieva Y, Bankova V, Christov R, Popov S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J Ethnopharmacol.* 1999;64(3):235–40.
 111. Mohammadzadeh S, Shariatpanahi M, Hamedi M, Ahmadkhaniha R, Samadi N, Ostad SN. Chemical composition, oral toxicity and antimicrobial activity of Iranian propolis. 103(4):1097–103.
 112. Bankova V. Recent trends and important developments in propolis research. *Inst Org Chem with Cent Phytochem Bulg Acad Sci.* 2005;2(1):29–32.
 113. Bonvehí JS, Bermejo FJO. Element content of propolis collected from different areas of South Spain. *Environ Monit Assess.* 2012;185(7):6035–47.
 114. Ahamad A, Kaleem M, Ahmed Z, Shafiq H. Therapeutic potential of flavonoids and their mechanism of action against microbial and viral infections—A review. *Food Res Int.* 2015;77:221–35.
 115. Martínez-Flórez S, González-Gallego J, Culebras JM, Tuñón M. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr Hosp.* 2002;17(6):271–8.
 116. Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DEC, Boelens PG, van Norren K, van Leeuwen

- PAM. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr.* 2001;74(4):418–25.
117. Tsao R. Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients.* 2010;2:1231–46.
 118. Rathee P, Chaudhary H, Rathee S, Rathee D, Kumar V, Kohli K. Mechanism of action of flavonoids as anti-inflammatory agents: a review. *Inflamm Allergy - Drug Targets.* 2009;8(3):229–35.
 119. Silici S, Kutluca S. Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. *J Ethnopharmacol.* 2005;99(1):69–73.
 120. Melliou E, Stratis E, Chinou I. Volatile constituents of propolis from various regions of Greece-Antimicrobial activity. *Food Chem.* 2007;103(2):375–80.
 121. Bankova VS, Christov R, Tejera AD. Lignans and other constituents of propolis from the Canary Islands. *Phytochemistry.* 1998;49(5):1411–5.
 122. Sahinler N, Kaftanoglu O. Natural product propolis: chemical composition. *Nat Prod Res.* 2005;19(2):183–8.
 123. Yang C, Luo L, Zhang H, Yang X, Lv Y, Song H. Common aroma-active components of propolis from 23 regions of China. *J Sci Food Agric.* 2010;90(7):1268–82.
 124. de Albuquerque IL, Alves LA, Lemos TLG, Dorneles CA, de Moraes MO. Constituents of the essential oil of Brazilian green propolis from Brazil. *J Essent Oil Res.* 2008;20(5):414–5.
 125. Junior MRM, Dausch A, Moraes CS, Queiroga CL, Pastore GM, Parki YK. Comparison of volatile and polyphenolic compounds in Brazilian green propolis and its botanical origin *Baccharis dracunculifolia*. *Ciência e Tecnol Aliment.* 2008;28(1):178–81.
 126. Diaz NJ, Quevedo AO, Luna SB. Determination of Fe, Mn, Zn and Cu in an ethanolic extract of Cuban propolis. *Rev Cienc Quim.* 1997;28:93–5.
 127. Banskota AH, Tezuka Y, Kadota S. Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phyther Res.* 2001;15(7):561–71.
 128. Campos JF, dos Santos UP, Macorini LFB, de Melo AMMF, Balestieri JBP, Paredes-Gamero EJ, Cardoso CAL, de Picoli Souza K, dos Santos EL. Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities of propolis from *Melipona orbignyi* (Hymenoptera, Apidae). *Food Chem Toxicol.* 2014;65:374–80.
 129. Nakajima Y, Shimazawa M, Mishima S, Hara H. Water extract of propolis and its main constituents, caffeoylquinic acid derivatives, exert neuroprotective effects via antioxidant actions. *Life Sci.* 2007;80(4):370–7.
 130. Shimazawa M, Chikamatsu S, Morimoto N, Mishima S, Nagai H, Hara H. Neuroprotection by Brazilian green propolis against *in vitro* and *in vivo* ischemic neuronal damage. *Evidence-Based Complement Altern Med.* 2005;2(2):201–7.

131. Orsi RO, Sforcin JM, Funari SRC, Bankova V. Effects of Brazilian and Bulgarian propolis on bactericidal activity of macrophages against *Salmonella Typhimurium*. *Int Immunopharmacol*. 2005;5(2):359–68.
132. Cuesta A, Rodríguez A, Esteban MÁ, Meseguer J. *In vivo* effects of propolis, a honeybee product, on gilthead seabream innate immune responses. *Fish Shellfish Immunol*. 2005;18(1):71–80.
133. Machado JL, Assunção AKM, da Silva MCP, dos Reis AS, Costa GC, de Sousa Arruda D, Rocha BA, de Oliveira Lima Leite Vaz MM, de Andrade Paes AM, Guerra RNM, Berretta AA, do Nascimento FRF. Brazilian Green Propolis: Anti-Inflammatory Property by an Immunomodulatory Activity. *Evidence-Based Complement Altern Med*. 2012;1–10.
134. Orsatti CL, Missima F, Pagliarone AC, Bachiega TF, Búfalo MC, Araújo JP, Sforcin JM. Propolis immunomodulatory action *in vivo* on toll-like receptors 2 and 4 expression and on pro-inflammatory cytokines production in mice. *Phyther Res*. 2010;24(8).
135. Búfalo MC, Bordon-Graciani AP, Conti BJ, de Assis Golim M, Sforcin JM. The immunomodulatory effect of propolis on receptors expression, cytokine production and fungicidal activity of human monocytes. *J Pharm Pharmacol*. 2014;66(10):1497–504.
136. El-Sayed E-SM, Abo-Salem OM, Aly HA, Mansour AM. Potential antidiabetic and hypolipidemic effects of propolis extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Pak J Pharm Sci*. 2009;22(2).
137. Zhu W, Chen M, Shou Q, Li Y, Hu F. Biological activities of Chinese propolis and Brazilian propolis on streptozotocin-induced type 1 diabetes mellitus in rats. *Evidence-Based Complement Altern Med*. 2011;2011:1–8.
138. Kitamura H, Naoe Y, Kimura S, Miyamoto T, Okamoto S, Toda C, Shimamoto Y, Iwanaga T, Miyoshi I. Beneficial effects of Brazilian propolis on type 2 diabetes in *ob/ob* mice. *Adipocyte*. 2013;2(4):227–36.
139. Koya-Miyata S, Arai N, Mizote A, Taniguchi Y, Ushio S, Iwaki K, Fukuda S. Propolis prevents diet-induced hyperlipidemia and mitigates weight gain in diet-induced obesity in mice. *Biol Pharm Bull*. 2009;32(12):2022–8.
140. Watanabe MAE, Amarante MK, Conti BJ, Sforcin JM. Cytotoxic constituents of propolis inducing anticancer effects: a review. *J Pharm Pharmacol*. 2011;63(11):1378–86.
141. Teerasripreecha D, Phuwapraisirisan P, Puthong S, Kimura K, Okuyama M, Mori H, Kimura A, Chanchao C. *In vitro* antiproliferative/cytotoxic activity on cancer cell lines of a cardanol and a cardol enriched from Thai *Apis mellifera* propolis. *Complement Altern Med*. 2012;12(1).
142. Kamiya T, Nishihara H, Hara H, Adachi T. Ethanol extract of Brazilian red propolis induces apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells through endoplasmic reticulum stress. *J Agric Food Chem*. 2012;60(44):11065–70.

143. Oršolić N, Knežević AH, Šver L, Terzić S, Bašić I. Immunomodulatory and antimetastatic action of propolis and related polyphenolic compounds. *J Ethnopharmacol.* 2004;94(2–3):307–15.
144. Masashi I, Naoi K, Hashita M, Itoh Y, Suzui M. Growth inhibitory activity of ethanol extracts of Chinese and Brazilian propolis in four human colon carcinoma cell lines. *Oncol Rep.* 2009;(22):349–54.
145. Missima F, Pagliarone AC, Orsatti CL, Araújo JP, Sforcin JM. The Effect of propolis on Th1/Th2 cytokine expression and production by melanoma-bearing mice submitted to stress. *Phyther Res.* 2010;24(10):1501–7.
146. Li H, Kapur A, Yang J, Srivastava S, McLeod D, Paredes-Guzman J, Dausch A, Park Y, Rhim J. Antiproliferation of human prostate cancer cells by ethanolic extracts of Brazilian propolis and its botanical origin. *Int J Oncol.* 2007;31(3):601–6.
147. Huang W-J, Huang C-H, Wu C-L, Lin J-K, Chen Y-W, Lin C-L, Chuang S-E, Huang C-Y, Chen C-N. Propolin G, a prenylflavanone, isolated from Taiwanese propolis, induces caspase-dependent apoptosis in brain cancer cells. *J Agric Food Chem.* 2007;55(18):7366–76.
148. Amoros M, Sauvager F, Girre L, Cormier M. *In vitro* antiviral activity of propolis. *Apidologie.* 1992;23(3):231–40.
149. Nolkemper S, Reichling J, Sensch KH, Schnitzler P. Mechanism of herpes simplex virus type 2 suppression by propolis extracts. *Phytomedicine.* 2010;17(2):132–8.
150. Hady FKA El, Hegazi AG. Egyptian Propolis: 2. Chemical Composition, Antiviral And Antimicrobial Activities Of East Nile Delta Propolis. *Zeitschrift für Naturforsch C.* 2002;57:3–4.
151. Gekker G, Hu S, Spivak M, Lokensgard JR, Peterson PK. Anti-HIV-1 activity of propolis in CD4+ lymphocyte and microglial cell cultures. *J Ethnopharmacol.* 2005;102(2):158–63.
152. Shimizu T, Hino A, Tsutsumi A, Park YK, Watanabe W, Kurokawa M. Anti-influenza virus activity of propolis *in vitro* and its efficacy against influenza infection in mice. *Antivir Chem Chemother.* 2008;19(1):7–13.
153. Boukraâ L, Abdellah F, Ait-Abderrahim L. Antimicrobial properties of bee products and medicinal plants. *Formatex.* 2013;960–70.
154. Onlen Y, Tamer C, Oksuz H, Duran N, Altug ME, Yakan S. Comparative trial of different anti-bacterial combinations with propolis and Ciprofloxacin on *Pseudomonas keratitis* in rabbits. *Microbiol Res.* 2007;162(1):62–8.
155. Stepanović S, Antić N, Dakić I, Švabić-Vlahović M. *In vitro* antimicrobial activity of propolis and synergism between propolis and antimicrobial drugs. *Microbiol Res.* 2003;158(4):353–7.
156. Yang H-Y, Chang C-M, Chen Y-W, Chou C-C. Inhibitory effect of propolis extract on the growth of *Listeria monocytogenes* and the mutagenicity of 4-nitroquinoline-N-oxide. *J Sci Food Agric.* 2006;86(6):937–43.

157. Grange JM, Davey RW. Antibacterial Properties of Propolis (Bee Glue). *J R Soc Med.* 1990;83(3):159–60.
158. Victorino FR, Franco SL, Svidzinski TIE, Avila-Campos MJ, Cuman RKN, Hidalgo MM, Bersani-Amado CA. Pharmacological evaluation of propolis solutions for endodontic use. *Pharm Biol.* 2007;45(9):721–7.
159. Liberio SA, Pereira ALA, Dutra RP, Reis AS, Araújo MJAM, Mattar NS, Silva LA, Ribeiro MNS, Nascimento FRF, Guerra RNM, others. Antimicrobial activity against oral pathogens and immunomodulatory effects and toxicity of geopropolis produced by the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. *BMC Complement Altern Med.* 2011;11(1):108.
160. Savka MA, Dailey L, Popova M, Mihaylova R, Merritt B, Masek M, Le P, Nor SRM, Ahmad M, Hudson AO, others. Chemical composition and disruption of quorum sensing signaling in geographically diverse United States propolis. *Evidence-Based Complement Altern Med.* 2015;Article ID:10.
161. Silici S, Koç NA, Ayangil D, Çankaya S. Antifungal activities of propolis collected by different races of honeybees against yeasts isolated from patients with superficial mycoses. *J Pharmacol Sci.* 2005;99(1):39–44.
162. Siqueira ABS, Rodriguez LRN de A, Santos RKB, Marinho RRB, Abreu S, Peixoto RF, Gurgel BC de V. Antifungal activity of propolis against *Candida* species isolated from cases of chronic periodontitis. *Braz Oral Res.* 2015;29(1):1–6.
163. Oliveira ACP, Shinobu CS, Longhini R, Franco SL, Svidzinski TIE. Antifungal activity of propolis extract against yeasts isolated from onychomycosis lesions. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2006;101(5):493–7.
164. Righi AA, Alves TR, Negri G, Marques LM, Breyer H, Salatino A. Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. *J Sci Food Agric.* 2011;91(13):2363–70.
165. Sung S-H, Choi G-H, Lee N-W, Shin B-C. External use of propolis for oral, skin, and genital diseases: a systematic review and meta-analysis. *Evidence-Based Complement Altern Med.* 2017;2017:1–10.
166. Chalmers, Castellani. Catalogue of life. *Int J Syst Bacteriol.* 1919;30:296.
167. Evans. Catalogue of life. *Int J Syst Bacteriol.* 1916;30:265.
168. Migula. *System der Bakterien.* 1900;2.
169. Gillum AM, Tsay EYH, Kirsch DR. Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae* *ura3* and *E. coli* *pyrF* mutations. *MGG Mol Gen Genet.* 1984;198(1):179–82.
170. Perfect JR, Lang SD, Durack DT. Chronic cryptococcal meningitis: a new experimental model in rabbits. *Am J Pathol.* 1980;101(1):177–94.
171. Yarrow D, Meyer SA. Proposal for amendment of the diagnosis of the genus *Candida*. *Berkhout nom cons Int J Syst Bacteriol.* 1978;28(4):611–5.

172. Benavente-García O, Castillo J, Lorente J, Ortuño A, Rio JA Del. Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. *Food Chem.* 2000;68(4):457–62.
173. Huang D, Boxin OU, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem.* 2005;53(6):1841–56.
174. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual. Mol cloning a Lab manual.* 1989;(Ed. 2).
175. Picazo JJ. *Procedimientos en Microbiología Clínica [Internet].*
176. Argüelles JC, Rodríguez T, Alvarez-Peral FJ. Trehalose hydrolysis is not required for human serum-induced dimorphic transition in *Candida albicans*: evidence from a tps1/tps1 mutant deficient in trehalose synthesis. *Res Microbiol.* 1999;150(8):521–9.
177. Petelinc T, Polak T, Demšar L, Jamnik P. Fractionation of phenolic compounds extracted from propolis and their activity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One.* 2013;8(2).
178. Bodey GP, Bolivar R, Fainstein V, Jadeja L. Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev Infect Dis.* 1983;5(2):279–313.
179. Nataro J, Kaper J. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.* 1998;11(1):142–201.
180. Eggimann P, Garbino J, Pittet D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *Lancet Infect Dis.* 2003;3(11):685–702.
181. Sudbery P, Gow N, Berman J. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.* 2004;12(7):317–24.
182. Catón Lacasa E, Martín Mazuelos E, Espinel Ingroff A. Pruebas estandarizadas para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos. *Guía Práctica Identificación y Diagnóstico en Micol Clínica.* 2007;1–24.
183. Cuenca-estrella M, Alastruey-izquierdo A. Estudios de sensibilidad en levaduras. Actualización y novedades. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2013;31(Supl 1):53–8.
184. Fortún J. Actualización en terapia antifúngica: nuevos fármacos e indicaciones. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2011;29(5):38–44.
185. Butts A, Palmer GE, Rogers PD. Antifungal adjuvants: Preserving and extending the antifungal arsenal. *Virulence.* 2016;8(2):198–210.
186. Wuyts J, Van Dijck P, Holtappels M. Fungal persister cells: The basis for recalcitrant infections? *PLoS Pathog.* 2018;14(10):1–14.
187. Tallarida RJ. Drug Combinations: Tests and analysis with isoboles: Drug combinations: Isoboles. *Current Protocols in Pharmacology.* 2017. p. 1–32.
188. Noori AL, Al-Ghamdi A, Ansari MJ, Al-Attal Y, Salom K. Synergistic effects of honey and propolis toward drug multi-resistant *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans* isolates in single and polymicrobial cultures. *Int J Med Sci.*

- 2012;9(9):793.
189. Onlen Y, Duran N, Atik E, Savas L, Altug E, Yakan S, Aslantas O. Antibacterial activity of propolis against MRSA and synergism with topical mupirocin. *J Altern Complement Med.* 2007;13(7):713–8.
 190. Hao L, Ran W, Xiang-xin L, Lu-Qun W, Xiao-ning Y. Carnosic acid-combined arsenic trioxide antileukaemia cells in the establishment of NB4/SCID mouse model. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2016;119(3):259–66.
 191. Sugar AM, Hitchcock CA, Troke PF, Picard M. Combination therapy of murine invasive candidiasis with Fluconazole and Amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39(3):598–601.
 192. Sanati H, Ramos CF, Bayer AS, Ghannoum MA. Combination therapy with Amphotericin B and fluconazole against invasive candidiasis in neutropenic-mouse and infective-endocarditis rabbit models. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997;41(6):1345–8.
 193. Smego RA, Perfect JR, Durack DT. Combined therapy with Amphotericin B and 5-Fluorocytosine for *Candida* meningitis. *Rev Infect Dis.* 1984;6(6):791–801.
 194. Sun C, Wu Z, Wang Z, Zhang H. Effect of ethanol/water solvents on phenolic profiles and antioxidant properties of Beijing propolis extracts. 2015:1–9.
 195. Kumazawa S, Hamasaka T, Nakayama T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chem.* 2004;84(3):329–39.
 196. Mohammadzadeh S, Sharriatpanahi M, Hamedi M, Amanzadeh Y, Ebrahimi SES, Ostad SN. Antioxidant power of Iranian propolis extract. *Food Chem.* 2007;103(3):729–33.
 197. Cigut T, Polak TZ, Ga L, Raspor P, Jamnik P. Antioxidative Activity of Propolis Extract in Yeast Cells. *J Agric Food Chem.* 2011;59:11449–55.
 198. Kolaczowski M, Kolaczowska A, Motohashi N, Michalak K. New high-throughput screening assay to reveal similarities and differences in inhibitory sensitivities of multidrug ATP-Binding Cassette Transporters. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(4):1516–27.
 199. Sun L-P, Chen A-L, Hung H-C, Chien Y-H, Huang J-S, Huang C-Y, Chen Y-W, Chen C-N. Chrysin: a histone deacetylase 8 inhibitor with anticancer activity and a suitable candidate for the standardization of Chinese propolis. 2012;
 200. Samarghandian S, Nezhad MA, Mohammadi G. Role of caspases, Bax and Bcl-2 in chrysin-induced apoptosis in the A549 human lung adenocarcinoma epithelial cells. *Anticancer Agents Med Chem.* 2014;14(6):901–9.
 201. Geibel M. Sensitivity of the fungus *Cytospora personii* to the flavonoids of *Prunus cerasus*. *Phytochemistry.* 1995;3(38):599–601.
 202. Kachadourian R, Leitner H, Day B. Selected flavonoids potentiate the toxicity of cisplatin in human lung adenocarcinoma cells: A role for glutathione depletion. *Int J*

- Oncol. 2007;31(1):161–8.
203. Ito S, Wakamatsu K, Sarna T. Photodegradation of eumelanin and pheomelanin and its pathophysiological implications. *Photochem Photobiol.* 2018;94(3):409–20.
 204. Maione F, Cantone V, Pace S, Chini MG, Bisio A, Romussi G, Pieretti S, Werz O, Koeberle A, Mascolo N, Bifulco G. Anti-inflammatory and analgesic activity of carnosol and carnosic acid *in vivo* and *in vitro* and in silicoanalysis of their target interactions: Anti-inflammatory response of CA and CS. *174(11):1497–508.*
 205. Jung K-A, Kwak M-K, Jung K-A, Kwak M-K. The Nrf2 System as a potential target for the development of indirect antioxidants. *Molecules.* 2010;15(10):7266–91.
 206. Moi P, Chant K, Asunis I, Cao A, Kant YW, Kan YW. Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the f-globin locus control region. Vol. 91, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1994.
 207. Barajas B, Che N, Yin F, Rowshanrad A, Orozco LD, Gong W, Wang X, Castellani LW, Reue K, Lusic AJ, Araujo JA. NF-E2-related factor 2 promotes atherosclerosis by effects on plasma lipoproteins and cholesterol transport that overshadow antioxidant protection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31(1):58–66.
 208. Kim D-H, Park K-W, Chae IG, Kundu J, Kim E-H, Kundu JK, Chun K-S. Carnosic acid inhibits STAT3 signaling and induces apoptosis through generation of ROS in human colon cancer HCT116 cells. *Mol Carcinog.* 2016;55(6):1096–110.
 209. Satoh T, Kosaka K, Itoh K, Kobayashi A, Yamamoto M, Shimojo Y, Kitajima C, Cui J, Kamins J, Okamoto S, Izumi M, Shirasawa T, Lipton SA. Carnosic acid, a catechol-type electrophilic compound, protects neurons both *in vitro* and *in vivo* through activation of the Keap1/Nrf2 pathway via S-alkylation of targeted cysteines on Keap1. *J Neurochem.* 2008;104(4):1116–31.
 210. Fujita S-I, Lasker BA, Lott TJ, Reiss E, Morrison CJ. Microtitration plate enzyme immunoassay to detect PCR-amplified DNA from *Candida* species in blood. Vol. 33, *Journal of Clinical Microbiology.* 1995.
 211. Hee Shin J, Nolte FS, Holloway BP, Morrison CJ. Rapid identification of up to three *Candida* species in a single reaction tube by a 5 exonuclease assay using fluorescent DNA probes. Vol. 37, *Journal of Clinical Microbiology.* 1999.
 212. Farmaindustria. El empleo en la industria farmacéutica (2017). 2019.
 213. Jordán MJ, Castillo J, Bañón S, Martínez-Conesa C, Sotomayor JA. Relevance of the carnosic acid/carnosol ratio for the level of Rosemary diterpene transfer and for improving lamb meat antioxidant status. *Food Chem.* 2014;151:212–8.
 214. Scudellari M. The science myths that will not die. Vol. 528, *Nature.* 2015. p. 322–5.
 215. Metodiewa D, Jaiswal AK, Cenas N, Dickançaité E, Segura-Aguilar J. Quercetin may act as a cytotoxic prooxidant after its metabolic activation to semiquinone and quinoidal product. *Free Radic Biol Med.* 1999;26(1–2):107–16.

216. Halliwell B. Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and *in vivo* studies? Vol. 476, Archives of Biochemistry and Biophysics. Academic Press; 2008. p. 107–12.
217. Vella F, Ferry G, Delagrangé P, Boutin JA. NRH:quinone reductase 2: An enzyme of surprises and mysteries. *Biochem Pharmacol.* 2005;71(1–2):1–12.
218. Zhang Y, Smuts JP, Dodbiba E, Rangarajan R, Lang JC, Armstrong DW. Degradation study of carnosic acid, carnosol, rosmarinic acid, and Rosemary extract (*Rosmarinus officinalis* L.) assessed using HPLC. *J Agric Food Chem.* 2012;60(36):9305–14.