



UNIVERSIDAD MAYOR

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

ACTIVIDAD ANTIMICÓTICA DE UN PROPÓLEOS CHILENO FRENTE A DISTINTAS ESPECIES DE *CANDIDA*: ESTUDIO *IN VITRO*

ASIGNATURA: MICROBIOLOGÍA

AUTORES: SEBASTIÁN LADRÓN DE GUEVARA SOTO

CARLA PACASSE LÓPEZ

PROFESOR GUÍA: DRA. INÉS CALDERÓN

PROFESOR JEFE ASIGNATURA: DRA. INÉS CALDERÓN

SANTIAGO, 2015

INDICE

	Página
Introducción.....	1
Marco Teórico.....	3
Hipótesis y Objetivos.....	11
Materiales y Métodos.....	12
Resultados.....	18
Discusión.....	24
Conclusión.....	27
Resumen.....	28
Referencias Bibliográficas.....	29
Anexos.....	34

AGRADECIMIENTOS

A nuestra Profesora Guía Dra. Inés Calderón por aceptar trabajar con nosotros, apoyarnos durante todo el proceso de realización de nuestro trabajo, dispuesta a solucionar nuestras dudas y darnos un consejo. Siempre entregando su tiempo y experiencia.

Señor Enrique Saldías Navarro, por proporcionar los materiales básicos para la realización de nuestra tesis. Por otro lado, su amabilidad e interés en traspasar su conocimiento acerca del propóleos.

A la Señora Teresa y Karina, encargadas del laboratorio de prepasso, por estar siempre dispuestas a ayudarnos y hacer fácil y grato trabajar en el laboratorio.

A nuestros padres y seres queridos, que nos han apoyado en este largo camino de estudio y muy especialmente en esta última etapa. Siendo una fuente de apoyo constante e incondicional a lo largo de nuestras vida, muchas gracias.

1. INTRODUCCIÓN

La candidiasis, es una de las micosis más importantes y de mayor frecuencia en la cavidad bucal; afecta a ambos sexos y a cualquier edad, aunque es más frecuente en los extremos de la vida ⁽⁶⁶⁾. Los hongos del género *Candida* son habitantes habituales en boca, sistema gastrointestinal, piel y vagina, por lo que son considerados agentes infecciosos endógenos específicos. Son poco virulentos, no son transmisibles y solo producen infección de la mucosa en presencia de una predisposición local, general manifiesta o ambas; de ahí que sean considerados hongos oportunistas ⁽⁶⁶⁾. En relación con la prevención y/o tratamiento de la candidiasis, los métodos principales incluyen el uso de agentes antimicrobianos tales como nistatina y fluconazol ⁽⁵²⁾.

La candidiasis al ser una patología prevalente y difícil de erradicar, ha planteado el desafío de buscar nuevas opciones de tratamientos para evitar reacciones adversas, bajar costos y la posibilidad de una terapia alternativa natural.

Recientemente, se ha puesto especial atención a las indicaciones médicas de un producto natural, denominado propolis o propóleos, el que ha mostrado interesantes propiedades medicinales. Es un compuesto natural elaborado por abejas productoras de miel (*Apis mellifera*) a partir de la resina y exudados de varias plantas. Las abejas recolectan el exudado vegetal y forman pequeños grumos con sus mandíbulas, mezclando dicho exudado con cera y productos de sus glándulas salivales. El material resultante es usado para fortificar el panal, proveyendo protección frente a microorganismos; como una sustancia para embalsamar el cuerpo de algún invasor, y así impedir su descomposición. Además, el propóleos presenta entre otras numerosas propiedades biológicas, actividad antimicrobiana ⁽⁵⁸⁾. Según diversos autores el propóleos posee actividad antibacteriana, antiviral, antiparasitaria y también antifúngica ⁽³⁹⁾.

En el mercado existen diversas formas de presentación: en bruto, procesado y procesado como componente de otros productos naturales. El procesado se presenta en forma de extracto líquido junto con algún solvente inocuo para el organismo, siendo el principal solvente el etanol ⁽³⁹⁾.

La actividad biocida de propóleos frente a *Streptococcus mutans*, fue estudiada el 2002 en Chile por Guzmán ⁽²⁵⁾, quien determinó una Concentración Inhibitoria Mínima (MIC) de 800 µg/mL. Fajuri *et al* ⁽¹⁹⁾, estudiaron el efecto del propóleos sobre diferentes microorganismos patógenos orales. Posteriormente el año 2006 Del Río Martínez ⁽⁶⁾, obtuvo resultados positivos, investigando la actividad biocida de un tipo de propóleos chileno, marca Apiherbal®, frente al crecimiento *in vitro* de aislados bacterianos de *Porphyromonas gingivalis*, obtenidos de pacientes chilenos con periodontitis.

Bajo este contexto se abre la línea de investigación de los diferentes efectos que puede tener el propóleo frente a microorganismos presentes en la cavidad oral, en especial frente a la *Candida*. El año 2008 María Quintero obtuvo resultados positivos estudiando el “Efecto de extractos de propóleos mexicanos de *Apis mellifera* sobre el crecimiento *in vitro* de *Candida albicans*. De manera que se plantea el desafío de investigar el efecto que tiene este tipo de propóleos chileno Apiherbal® (V región) en la distintas especies de *Candida* (estudio *in vitro*) ⁽⁵⁰⁾.

2. MARCO TEÓRICO

La candidiasis es una infección producida por especies de *Candida*, siendo éstas la más comunes dentro de las infecciones fúngicas que afectan al ser humano. Las especies de *Candida* producen una amplia gama de infecciones que van desde lesiones mucocutáneas no mortales hasta procesos invasivos que pueden implicar prácticamente cualquier órgano ^(48,52).

El término de candidiasis oral corresponde a una infección fúngica producida en la cavidad bucal por cualquiera de las especies de *Candida*, siendo la *Candida albicans* la más común ⁽¹⁷⁾. La manifestación clínica de ésta se caracteriza por la formación de membranas blanquecinas que se adhieren a la mucosa por infiltración epitelial del microorganismo, siendo fácilmente desprendible al raspado ⁽⁵⁶⁾.

Clasificación

Se han propuesto numerosas clasificaciones de la candidiasis oral de acuerdo a su presentación clínica, sintomatología y la interrelación con factores sistémicos variados. Una de las más usadas es la clasificación propuesta por Sitheeque y Samaranayake ⁽⁶⁰⁾, que clasifica las candidiasis en dos grupos: candidiasis oral primaria y candidiasis oral secundaria.

La candidiasis oral primaria se subdivide en aguda que incluye: pseudomembranosa y eritematosa; y las crónicas que son: hiperplásica y eritematosa. También están las lesiones asociadas a candidiasis y dentro de este grupo tenemos la estomatitis subprotésica, la queilitis angular, glositis romboidal media y eritema lineal gingival ⁽³⁰⁾. La candidiasis oral secundaria se caracteriza por manifestaciones orales de candidiasis mucocutánea como consecuencia de enfermedades sistémicas.

Prevalencia

En un estudio realizado sobre la prevalencia de lesiones en la mucosa oral en adultos sobre 65 años de Santiago de Chile, se determinó que el 53% presenta una o más lesiones en la cavidad bucal y reveló que el uso de prótesis incrementa la probabilidad de aparición de lesiones. La lesión más común fue la estomatitis subprotésica con un 22,3%, la queilitis angular con un 2,9 % y la glositis romboidal media un 1% ⁽¹⁸⁾.

Etiopatogenia

Candida albicans es la principal causante de las lesiones orales, es un microorganismo comensal de la cavidad bucal, pero por alteraciones en los factores locales y/o sistémicos se transforma en microorganismo patógeno. Su morfología va de blastosporas a hifas verdaderas penetrando en la mucosa y estableciendo un proceso infeccioso con activación de la reacción inflamatoria ^(38,51). En general la *Candida albicans* es de patogenicidad baja y su infección no ocurrirá mientras no existan

alteraciones locales como: deficiente función de glándulas salivales, drogas inhaladas como esteroides y uso de prótesis. La utilización de prótesis predisponen a la infección por *Candida* en hasta un 65%, en las personas de edad avanzada que usan prótesis totales superiores, debido a que producen un microambiente favorable al crecimiento de la *Candida* con bajos niveles de oxígeno, pH bajo y un ambiente anaerobio. Dentro de los factores sistémicos se encuentran los extremos de la vida debido a la reducción de su función inmunitaria, así como el uso de antibióticos de amplio espectro, de inmunosupresores, condiciones inmunosupresoras como el VIH; mientras otros factores podrían ser el tabaquismo y la diabetes, entre otros ⁽⁵⁹⁾.

Tratamiento

En casos leves de candidiasis se deben controlar los factores irritativos, extremar las medidas de higiene bucal así como la higiene de las prótesis, dejándolas reposar en la noche en un vaso con agua. Se pueden indicar antimicóticos tópicos específicos, ya sea de la familia de polienos (nistatina, anfotericina B) o de los azoles (miconazol, clotrimazol, ketoconazol, itraconazol y fluconazol), alguno de los cuales se pueden usar como enjuagues bucales o pastillas (tabletas para chupar) que generalmente se administran por 5 a 10 días.

La anfotericina B 10 mg y la nistatina en 500.000 Unidades son las más eficientes. La anfotericina B tiene un espectro mayor que la nistatina aunque la nistatina es efectiva cuando se aplica tópica en la cavidad oral, con la desventaja del gusto desagradable. La anfotericina B tiene como mecanismo de acción unirse a esteroides de la membrana celular del hongo alterando su permeabilidad y transporte. En suspensión tópica es efectivo en candidiasis aguda ^(16,18). La nistatina tiene un mecanismo de acción similar al anterior, con una alta toxicidad, no se usa vía parenteral, solo tópica, si se traga puede producir malestares estomacales y diarrea. Su dosis para candidiasis oral es de 500.000 Unidades 4 veces al día ⁽¹³⁾.

Por otro lado, el miconazol que pertenece a la familia de los azoles, tiene un mecanismo de acción de inhibición de la síntesis de lípidos, especialmente ergosteroles de la membrana celular, alterando la permeabilidad de la célula, su absorción tópica es buena logrando penetrar fácilmente el estrato córneo y persiste por más de 4 días en la piel ^(13,56).

Microbiología

Los hongos son microorganismo unicelulares o pluricelulares pertenecientes al reino Fungi, de reproducción asexual y sexual. En general se dividen en *Basidiomycota*, *Ascomycota*, *Zygomycota* (reproducción sexual y asexual) y *Deuteromycota* (reproducción asexual). Su estructura se divide en dos tipos: filamentosa cuya estructura básica es la hifa y la levadura que es unicelular, aunque puede formar una pseudo hifa y a veces incluso una hifa verdadera.

De las levaduras, la mayoría se incluye entre las *Deuteromycota*, pero algunas pueden tener reproducción sexual, el género *Candida* es el más conocidos y pertenece a la familia *Cryptococcoidiae*.

Es un microorganismo oportunista endógeno, miembro de la flora normal de la piel, mucosa y aparato gastrointestinal, coloniza los tejidos durante o poco después del nacimiento, y el riesgo de infección endógena siempre está presente. Metabolizan la glucosa en condiciones anaeróbicas como aeróbicas, la temperatura influye en su crecimiento a temperaturas más altas como 37 °C que están presentes en la cavidad bucal promueven el crecimiento de pseudohifas, requieren fuentes ambientales de carbono fijo para su crecimiento. Crecen como levaduras orales en gemación de 3 a 6 micrones de tamaño entre las células epiteliales, van formando pseudohifas cuando continúan su crecimiento producto de la formación de cadenas de células al no separar sus tabiques. La *Candida albicans* es considerada dimorfa, o sea pueden desarrollarse bajos dos formas: filamentosa y levaduriforme; pueden producir hifas verdaderas a 37°C y si está en un medio favorable produce clamidosporas grandes y esféricas ⁽⁴⁰⁾.

Morfológicamente para el diagnóstico en microscopia es importante saber las diferencias entre hifa (hongo filamentoso) y pseudo hifa (levaduras). La hifa presenta crecimiento por elongación lineal y posterior tabicación, tabiques rectos, célula terminal cilíndrica, paredes paralelas sin constricciones a nivel de tabique y ramificaciones laterales sin constricción ni punto de origen, primer tabique a distancia de la hifa principal. Las pseudohifa presenta crecimiento por gemación y posterior constricción basal, tabiques difíciles de ver y curvados, célula terminal redondeada, paredes con constricción a nivel de los tabiques y ramificaciones laterales constreñidas en un punto de origen, primer tabique en el lugar de origen de ramificación ⁽⁴⁰⁾.

La adhesión de la *Candida* a las paredes celulares epiteliales es un importante paso en la iniciación de la infección, la cual es promovida por componentes de la pared celular fúngica tales como manosa, receptores C3D, nanoproteínas y sacarinas ^(5,15).

Existen aproximadamente 200 especies de *Candida*. Fuera de la *Candida albicans* existen especies como *Candida glabrata*, *Candida dubliniensis*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilopsis*, *Candida stellatoidea*, *Candida guilliermondii*, *Candida pseudotropicalis*, *Candida krusei*, *Candida kefyr*, *Candida lusitaniae*, entre otras ^(34, 38, 40, 56).

Cultivo

Existen una variedad de medios de cultivo para el desarrollo de hongos entre ellos:

- Agar Dextrosa Sabouraud: Es un medio de propósito general diseñado por Sabouraud para el cultivo de dermatofitos. Un bajo pH de 5.6 aproximadamente favorece el crecimiento de hongos, con efecto ligeramente inhibitor para las bacterias contaminantes en muestras

clínicas. La adición de cloranfenicol es una modificación diseñada para aumentar la inhibición bacteriana y posibilitar el aislamiento de muestras contaminadas de hongos oportunistas que causan infecciones clínicas similares a las dermatofitosis pero sensibles a la cicloeximida incluidas en algunos medios fúngicos selectivos ⁽⁵⁵⁾.

- Agar base Pagano-Levin: Preparado según la formulación de Pagano Levin y Trejo, se utiliza para el aislamiento y diferenciación de especies de *Candida*. La diferenciación se basa en la capacidad de las especies de *Candida* para reducir TTC (2, 3,5-trifeniltetrazolium clorhidrato) lo que provoca un cambio de color. Dentro de las especies diferenciadas tenemos: *C.albicans* (cremoso a rosado pálido), *C.parapsilosis* (rojo a marrón), *C. krusei* (de un color más claro a rosado sin halo) y *C. tropicalis* (color gris a oscuro). Para inhibir el crecimiento de la mayoría de las bacterias que acompañan la muestra, este medio posee neomicina ⁽⁴¹⁾.
- Medio Candida Chrom Agar: Es un medio selectivo y de diferenciación para el aislamiento de hongos. Con la inclusión de sustratos cromógenos en el medio, las colonias de *C. albicans*, *C. tropicalis* y *C. krusei* producen colores diferentes, lo que permite la detección directa de estas especies de levadura en las placas de aislamiento. Las colonias de *C. albicans* presentan un color de verde claro a mediano, las colonias de *C. tropicalis* de azul verdoso a azul metálico y las colonias de *C. krusei* presentan color rosado claro con bordes blancuzco. Es posible que otras especies de levadura produzcan su color natural (crema) o presenten un color rosado o malva de claro a oscuro (*C. glabrata*). Una ventaja adicional del medio es la fácil detección de cultivos mixtos de levaduras, debido a los diferentes colores que presentan sus colonias. Este medio contiene cloranfenicol el cual inhibe la mayoría de los contaminantes bacterianos. Por estas características será el utilizado en este trabajo de investigación ⁽⁴⁵⁾.

Apiterapia

Es la ciencia que se ocupa del mantenimiento y/o restablecimiento de la salud mediante el uso de los productos de la colmena en los que se incluyen: veneno de abeja, miel, polen, jalea real, propóleos y cera de abeja ⁽¹⁴⁾. Las terapias que utilizan a las abejas han existido durante miles de años y algunas pueden ser tan antiguas como la propia medicina humana. El arte rupestre antiguo de cazadores recolectores tempranos representa a la abeja como fuente de la medicina natural. La terapia del veneno de abeja se practicaba en tres grandes civilizaciones: antiguo Egipto, Grecia y China, conocidas por su sistema médico altamente desarrollado. Hipócrates, el médico griego conocido como el “padre de la medicina”, reconoció las virtudes curativas del veneno de abeja para tratar la artritis y otros problemas en las articulaciones. Hoy en día, la creciente evidencia científica

sugiere que los diversos productos de la abeja promueven la curación mediante una mejoría en la circulación, disminución de la inflamación y la estimulación de la respuesta inmune. Es importante señalar que la apiterapia no es solo el uso del veneno de abeja llamada a menudo terapia Bee Sting, sino el uso de todos los productos de la colmena y por lo general una combinación de ellos. Estos productos a veces se mezclan con otros ingredientes especialmente diferentes aceites esenciales que dependen de la condición a tratar ⁽⁶²⁾.

Propóleos

La palabra “propóleos” se deriva del griego pro (por delante de o en la entrada) y polis (comunidad o ciudad) y significa una sustancia de defensa de la colmena. El propóleos es un compuesto resinoso y pegajoso elaborado por la abeja *Apis mellifera*, a partir de brotes de hojas de numerosas especies de árboles como el Abedul, Álamo, Pino, Aliso, Sauce, Palma y variadas plantas medicinales ⁽⁸⁾.

El uso del propóleos por parte del hombre data del año 300 A.C., época en la cual ya era utilizado en la elaboración de remedios en la medicina tradicional. Sin embargo en solo los últimos 60 años se han realizado la gran mayoría de los estudios con el objetivo de determinar la composición química, propiedades farmacológicas y en general, el uso farmacológico comercial de los preparados a base de propóleos ⁽²¹⁾.

En el mercado existen diversas formas de presentación: en bruto, procesado y procesado como componente de otros productos naturales. El procesado se presenta en forma de extracto líquido junto con algún solvente inocuo para el organismo, siendo el principal solvente el etanol ⁽³⁹⁾.

1. Composición química

El propóleos es una mezcla resinosa compleja que contiene aproximadamente un 50% de resina y bálsamo, 30% de cera, 10% de aceites esenciales y aromáticos, 5% de polen y 5% de impurezas ⁽⁶³⁾. La composición química de los propóleos es muy variable debido principalmente a la variabilidad de especies de plantas que crecen alrededor de la colmena, de las cuales las abejas recogen los exudados. Además la composición de propóleos puede variar dependiendo de la estacionalidad, la iluminación, la altitud, tipo de colector, la disponibilidad de alimentos y la actividad desarrollada durante la extracción del propóleos.

Hasta ahora, más de 300 componentes químicos se han identificado en el propóleos de diferentes regiones ^(4,64). Los principales compuestos químicos presentes en el propóleos son los denominados fenoles, los cuales constituyen más del 50% del peso total. Las propiedades médicas del propóleos son atribuidas principalmente a la presencia de estas sustancias. Más aún la literatura apunta que algunas de las actividades pueden estar fuertemente relacionadas con los

flavonoides, el principal compuesto fenólico del propóleo⁽⁶⁾. También contiene compuestos aromáticos, algunos aceites volátiles, terpenos y cera de abeja⁽⁶⁴⁾.

Los flavonoides son pigmentos vegetales, sintetizados a partir del aminoácido fenilalanina, los que generalmente exhiben colores brillantes como el de los pétalos de las flores. La mayoría de las veces emiten fluorescencia cuando son excitados por la luz ultravioleta, y se localizan en las células de las plantas verdes. Los flavonoides son usados por los botánicos para clasificación taxonómica.

Los flavonoides inhiben o destruyen muchas especies bacterianas, inhiben importantes enzimas virales, tales como la transcriptasa reversa y diversas proteasas, y además destruyen algunos importantes protozoos. Poseen actividad antialérgica, antiinflamatoria, antioxidante, atraparoras de radicales libres, antimutagénica y moduladora de actividad enzimática. Además, se puede decir que aporta grandes beneficios para la salud al actuar como agentes quimiopreventivos en cáncer y prevención de ataques al corazón. Su toxicidad a células animales es baja. Muchos profesionales están incrementando el uso de flavonoides puros para tratar muchas enfermedades importantes, debido a sus comprobadas habilidades de inhibir enzimas específicas, simular algunas hormonas, neurotransmisores y eliminar radicales libre⁽²⁶⁾.

2. Características físico-químicas

Chaillou *et al* analizaron muestras de propóleos de Argentina y determinaron lo siguiente:

- Características organolépticas: 100% de las muestras presentó estructura homogénea, 45% presentó un aspecto de trozos irregulares con brillo, el 30% con poco brillo, y el resto trozos irregulares opacos. Los ensayos de consistencia mostraron que el 40% de las muestras eran duras. el 45% eran poco blandas, y solamente un 15% blandas. Con respecto al color, el 65% de la muestra presentaron color marrón oscuro, un 20% marrón claro con tintes amarillos, un 10% con tintes castaños. El olor del 75% de las mismas fue resinoso, y el sabor de la totalidad del propóleos fue picante.
- Impurezas mecánicas, ceras y resinas: el valor medio de impurezas mecánicas analizada fue de 24,063%, contenido de cera promedio de 30,048% y el porcentaje de resina 44,770%
- Índices de oxidación, compuestos fenólicos y flavonoides: el rango de valores del índice de oxidación oscilo entre los 4 y 18 segundos, el promedio fue de 9,8 segundos⁽⁷⁾.

3. Actividad biológica

Las propiedades farmacológicas del propóleo son bien conocidas y están bien documentadas. La literatura actual señala propiedades antimicrobianas ^(49,61), fungicidas ^(42,61), antivirales ⁽²⁾, analgésicas ⁽¹¹⁾, antiinflamatorias ^(36,33), antiulcerosas-cicatrizantes ^(37,65), inmunoestimulantes ⁽³³⁾, anticancerígena ⁽²⁹⁾, antioxidantes ⁽⁴³⁾, y anticariogénica ^(23, 31,53).

Ensayos microbiológicos realizados con muestras de propóleos de diferentes sitios de la Zona Central de Chile, han mostrado una actividad heterogénea, y no se ha mostrado un patrón estable de actividad en las diferentes regiones geográficas, o durante las diferentes épocas del año ⁽¹²⁾.

Propóleos como antimicrobiano

Se ha demostrado que el propóleo tiene un amplio espectro de propiedades biológicas y farmacológicas, con efectos directos antimicrobianos *in vitro* ⁽⁶⁵⁾. Estudios recientes sugieren que el propóleo puede ser utilizado en medicina y odontología. Dentro de éstos existe el estudio de Darwish *et al*, los que obtuvieron resultados positivos en el efecto antibacteriano de un propóleo de Jordania contra *C. albicans* ⁽¹⁰⁾. En otro estudio se demostró que el extracto de propóleos posee *in vivo* actividad antimicrobiana contra *S. mutans* presente en la cavidad oral y puede ser utilizado como una medida alternativa para prevenir la caries dental ⁽¹⁶⁾. La actividad biocida *in vitro* de propóleos frente a *S. mutans*, fue estudiada el 2002 en Chile por Guzmán ⁽²⁵⁾, quien determinó una Concentración Inhibitoria Mínima (MIC) de 800 µg/mL. Fajuri *et al* ⁽¹⁹⁾, estudió el efecto del propóleo sobre diferentes microorganismos patógenos orales.

Posteriormente el año 2006 Del Río Martínez ⁽¹²⁾, obtuvo resultados positivos, investigando la actividad biocida de un tipo de propóleos chileno, marca Apiherbal®, frente al crecimiento *in vitro* de aislados bacterianos de *P. gingivalis*, obtenidos de pacientes chilenos con periodontitis.

El propóleo también presenta actividad anti fúngica. El año 2008 María Quintero obtuvo resultados positivos estudiando el “Efecto de extractos de propóleos mexicanos de *Apis mellifera* sobre el crecimiento *in vitro* de *C. albicans*”, el objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad anti fúngica de extractos etanólicos de propóleos de tres diferentes Estados de la República Mexicana, de cuatro extractos comerciales. El extracto obtenido en Cuautitán Izcalli Estado de México presentó la mayor actividad biocida, inhibiendo el 94,4% de los aislamientos clínicos a una concentración de 0,8 mg/mL; la cepa de referencia fue inhibida a una concentración de 0,6 mg/L. El efecto fue fungistático a bajas concentraciones y fungicida a concentraciones superiores a MIC (0.8 mg/mL) ⁽⁵⁰⁾. Sawaya A. *et al* determinó una Concentración Inhibitoria Mínima entre 6 mg/mL y 12 mg/mL al estudiar los distintos métodos *in vitro* utilizados para determinar el efecto que posee el propóleo sobre las distintas especies de *Candida* ⁽⁵⁷⁾.

Ota *et al* estudió la actividad fungicida de un extracto etanólico de propóleos frente a 15 cepas distintas de *Candida* encontrando una concentración inhibitoria mínima entre 3 mg/mL a 7 mg/mL. Por otro lado, las especies de *Candida* presentan una distinta sensibilidad al efecto del propóleos, en el cual se demostró una actividad anti fúngica clara del propóleos con el siguiente orden de sensibilidad: *C. albicans*>*C. tropicalis*>*C. krusei*>*C. guilliermondii* ⁽⁴⁶⁾.

A diferencia del estudio de Marielsa Gil *et al* en que se determinó el efecto fungistático y fungicida de una extracto etanólico de propóleos comercial al 70% v/v proveniente de un apiario del estado Cojedes Venezuela sobre cuatro especies de *Candida* (*C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, *C. albicans* y *C. glabrata*), el efecto fue medido a las 24 y 48 horas y se evidenció que el tiempo de incubación más eficaz fue el de 48 horas y que la especie más sensible fue *C. guilliermondii* y la especie más resistente fue *C. glabrata* ^(22,)

Reacciones adversas

La concentración recomendada para uso oral en humano es de 5 mg por kg de peso al día, de manera de evitar cualquier reacción no deseada ^(3,35).

Las reacciones adversas a la aplicación local de propóleos son escasas y se refieren generalmente a reacciones de hipersensibilidad de tipo dermatitis por contacto. Los reportes generalmente describen dermatitis en las zonas palmares y dedos, correspondiente a la manipulación de partes de la colmena que contienen propóleos, o bien, reacciones alérgicas en la mucosa oral o mucositis orales agudas con ulceraciones debido a la ingesta de grageas o gotas de propóleos. ^(20,27)

Los principales agente sensibilizante descubiertos en la composición de propóleos corresponden a 3-metil-2-butenil cafeato y feniletil cafeato. Posiblemente existan otros alérgenos no descubiertos a la fecha. ⁽²⁴⁾

En base a los antecedentes presentados, la candidiasis es considerada una de las micosis de la cavidad oral que tiene mayor prevalencia; es por esto que, el objetivo de este trabajo es determinar la MIC de un propóleos chileno (Apiherbal®) sobre el crecimiento de distintas especies de *Candida*, con muestras obtenidas de pacientes chilenos que presentaban manifestaciones clínicas de candidiasis al momento del examen intra-oral, de esta forma abrir puertas a la búsqueda de una terapia alternativa natural para esta enfermedad.

3. HIPOTESIS NULA

“El propóleo chileno de la V Región, marca Apiherbal®, no presenta actividad antimicótica frente a distintas especies de *Candida*”

4. OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar *in vitro* la actividad antimicótica de propóleo chileno Apiherbal®, frente a distintas especies de *Candida* orales, utilizando el método de la Concentración Inhibitoria Mínima (MIC).

OBJETIVO ESPECIFICO

- Aislar e identificar distintas especies de *Candida*, a partir de muestras de pacientes con manifestaciones clínicas de candidiasis orales.
- Establecer la Concentración Inhibitoria Mínima (MIC) del propóleo sobre el crecimiento de *Candidas* aisladas.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

- Propóleos Apiherbal®
- Etanol de Melaza al 96%
- Medios de cultivos: Agar Dextrosa Sabouraud, Agar Candida Chrom – Agar, Caldo Nutricio.
- Material de vidrio: matraces, placas Petri, tubos de ensayo Pyrex®, pipetas graduadas, vasos de precipitado.
- Equipos de laboratorio: Asas de platino, estufa de cultivo Binder®, 2 mecheros, trípode, gradillas para tubos de ensayo, algodón hidrófobo, autoclave All American® 25x, filtros Millipore®, papel Parafilm®, jeringa de 10mL, balanza de precisión Ohaus®, agitador magnético Velp Scientifica®, horno esterilizador, refrigeradores.
- Misceláneo: Masking tape, rotulador.

Método

Este trabajo de investigación consistió en un estudio experimental, el cual fue realizado en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Odontología de la Universidad Mayor, sede Santiago, cuyas variables correspondieron a variables cuantitativas continuas.

Preparación del medio de cultivo

Se preparará medio de cultivo Candida Chrom Agar, Agar Dextrosa Sabouraud y Caldo Nutricio según las indicaciones del fabricante, terminado este proceso se procede a vaciar en las respectivas placas Petri los dos primeros, y el caldo Caldo Nutricio fue vaciado en tubos de ensayo.

Toma de muestras

En este estudio se evaluaron 30 pacientes, portadores de prótesis de acrílico con o sin lesión clínica de candidiasis oral, pertenecientes a la junta de vecinos de Tilcoco, comuna de Quinta de Tilcoco, Región del Libertador Bernardo O'Higgins. Se excluyeron los pacientes que se encontraban bajo tratamiento antimicótico (tópico oral y/o sistémico) o lo hubiesen hecho en los últimos 6 meses. De los pacientes evaluados 20 de ellos cumplían con los criterios de inclusión por lo cual formaron parte del estudio.

Para cada participante se realizó una ficha (Anexo 1) donde se identificó al paciente, su RUT, edad, género, si presentó o no lesión clínica con su localización, si estuvo bajo tratamiento para candidiasis oral, si había consumido propóleos anteriormente y en qué presentación comercial. Los pacientes participantes firmaron un consentimiento informado (Anexo 2)

Para la toma de muestra, por cada paciente se dispuso un tubo de ensayo con suero fisiológico en su interior y un algodón, todos estos materiales estériles. Se realizó un raspaje de la lesión clínica de candidiasis con el algodón embebido en suero, con el cual se sembraron las respectivas placas con medio Candida Chrom Agar, las cuáles fueron rotuladas, selladas con papel parafilm ® y almacenadas en condiciones de oscuridad. Las placas fueron incubadas durante 48 horas a 35°C en una estufa de cultivo Binder®.

Identificación de las muestras

Las colonias desarrolladas fueron identificadas según la descripción macroscópica de A. Rambach, cultivadas en Candida Chrom Agar, como:

- *C. albicans* color de verde claro a mediano
- *C. tropicalis* de azul verdoso a azul metálico
- *C. krusei* color rosado claro con bordes blancuzco.

Preparación de propóleos

El propóleos, cuyo nombre comercial es Apiherbal®, fue recolectado en Junio del 2015 de los apiarios del señor Enrique Saldías, Técnico Microbiología Industrial y Alimentos, y empresario apícola; ubicados en una zona cercana a la comuna de Curacaví, Región de Valparaíso. El propóleos utilizado fue obtenido en trampas.



Fig. 1: Propóleos triturado (A) y colado (B)

El propóleos fue congelado, triturado y colado (Fig.1), luego se pesaron 1.8 g los cuales fueron diluidos en 1,5mL de alcohol al 96% y agitados hasta obtener una solución homogénea (Fig. 2). Resultando de este proceso una solución de propóleos con una concentración de 120mg/mL.

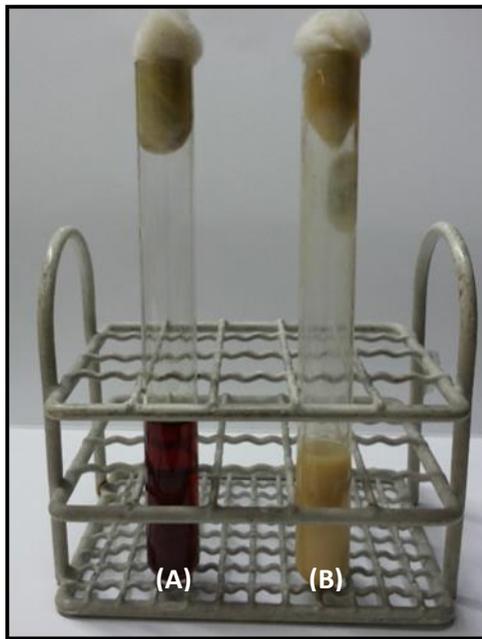


Fig. 2: Gradilla con tubo A que contiene propóleos diluido en alcohol a una concentración de 120 mg/mL. Tubo B corresponde al tubo maestro del antibiograma (12 mg/mL), preparado con 1 mL de la dilución del propóleos al 120 mg/mL más 9 mL de caldo nutriticio.

Dilución de la muestra

Se seleccionaron de cada muestra 2 de las colonias desarrolladas y se identificaron como x y x'

Luego de lo cual se hicieron suspensiones de estas colonias en 5mL de Caldo Nutricio hasta obtener una opacidad similar entre ellas, para su posterior utilización en la determinación de MIC.

Determinación de MIC

Para establecer la MIC de propóleos sobre las cepas de *Candida* se desarrollaron experimentos al estilo de un antibiograma.

Se preparó un tubo maestro con 9mL de caldo de cultivo más 1mL de la solución de propóleos de concentración 120 mg/mL, obteniendo una concentración resultante de 12 mg/mL.

Se preparó una batería de 10 tubos con 1 mL de caldo de cultivo menos el número 1. Desde el tubo maestro se agregó 1 mL al tubo 1 (vacío) y 1 mL al tubo 2. Luego desde el tubo 2 se extrajo 1 mL de solución el cual fue depositado en el tubo 3, del tubo 3 se extrajo 1 mL que fue depositado en el tubo 4 y así sucesivamente hasta el tubo 9, quedando el tubo número 10 como control de crecimiento de *Candida*. Desde el tubo 1 al 10 se les agregó 0,1mL de *Candida* previamente diluida a una opacidad similar (Fig.3). Este procedimiento se realizó para cada colonia seleccionada. Luego los tubos fueron cultivados en una estufa Binder® a 35°C por 48 horas.

Debido a las características de turbidez resultante, de la mezcla de la dilución de propóleos con el caldo nutritivo, es que tuvimos que enfrentar el problema que nos sería imposible observar el punto de inhibición del desarrollo microbiano en los antibiogramas, el que se define por la falta de turbidez de una concentración en la que no se han desarrollado los microorganismos, y por lo tanto el MIC, se decidió sembrar de cada tubo del antibiograma 0.05mL de cultivo en una placa con medio Agar Dextrosa Sabouraud, las que fueron incubadas en una estufa Binder® a 35°C por 48 horas, para posteriormente determinar la concentración mínima de propóleos capaz de eliminar las *Candidas* sembradas en los antibiogramas (Concentración Fungicida Mínima = MFC) (Fig.4).

Antibiograma para el Cálculo del MIC de Propóleos sobre *Candida*.

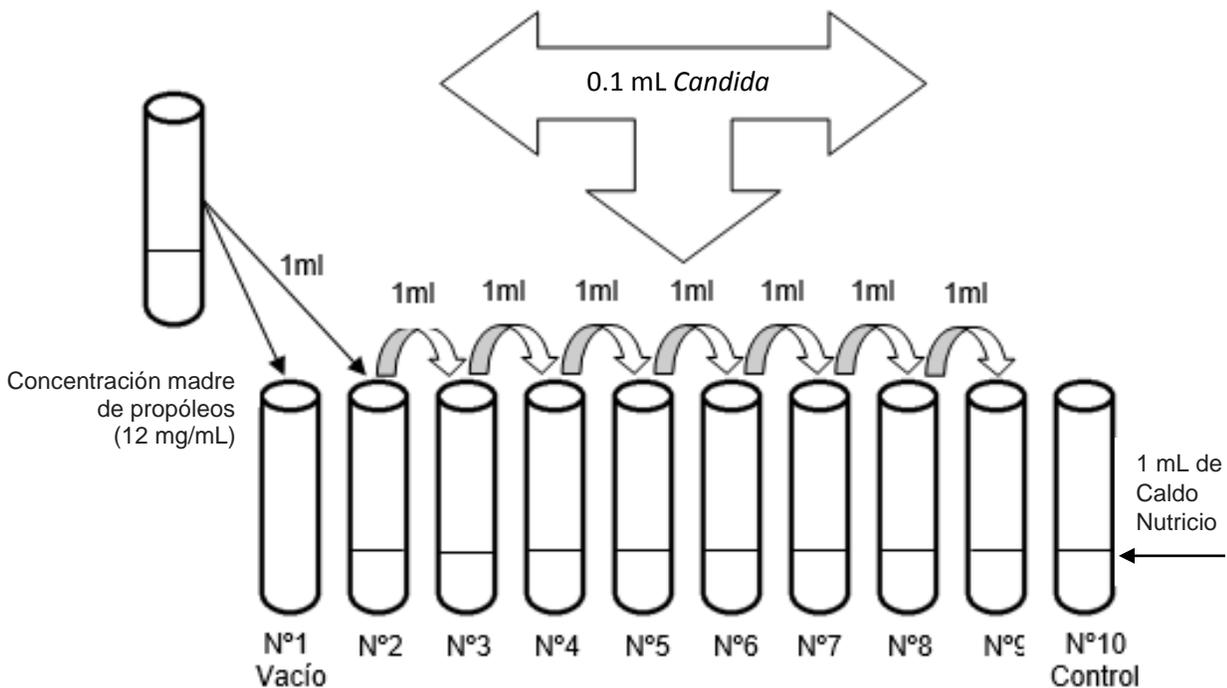


Fig.3: Esquema de montaje de los antibiogramas, proceso para la medición de la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC)

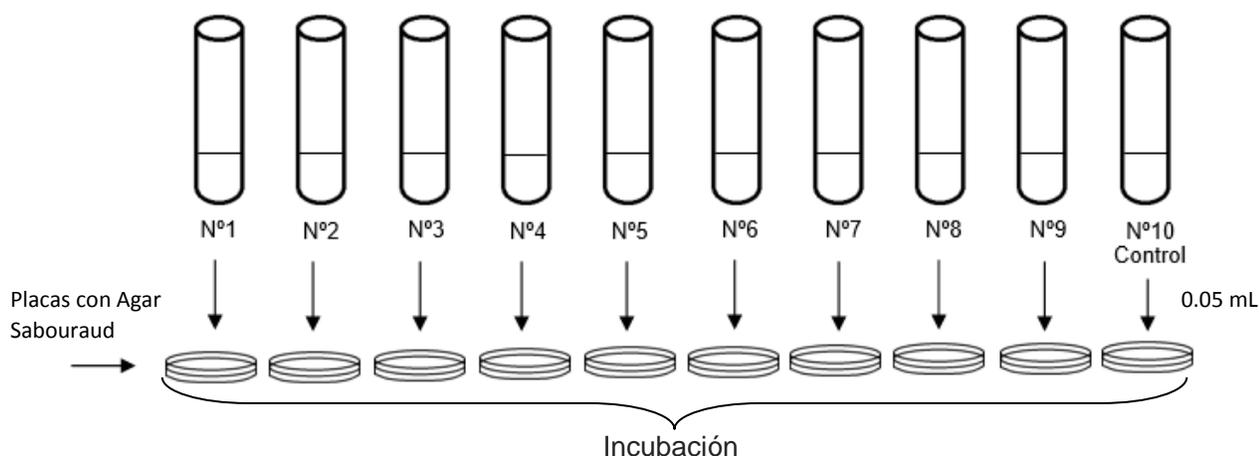


Fig.4: Esquema del montaje del ensayo para la medición de la Concentración Fungicida Mínima (MFC) de propóleos sobre *Candida*

Evaluación de la actividad antifúngica del alcohol utilizado como solvente del propóleos.

Este ensayo se realizó para establecer el efecto del etanol utilizado como solvente del propóleos en el antibiograma sobre el crecimiento de *Candida*.

Se preparó un tubo maestro de 9mL de caldo más 1mL de alcohol al 96% quedando a una concentración de 9,6% del cual se depositaron 1,5mL en 6 tubos diferentes. Se eligieron 3 colonias al azar, las cuales fueron suspendidas en estas soluciones en duplicado. Por otro lado, cada una de estas colonias fue suspendida en 1,5mL de caldo como control de crecimiento. Fueron incubadas en una estufa Binder® a 35°C por 48 horas.

Para determinar la ausencia o presencia de crecimiento se comparó con la opacidad de la solución del tubo control sin alcohol.

Análisis estadísticos resultados

Los resultados entregados por las placas fueron ordenados en tablas en el programa Microsoft Office Excel 2013. La significancia en la presencia o ausencia de crecimiento de las muestras de *Candida*, a las diferentes diluciones de propóleos probadas, se realizó mediante un análisis estadístico de regresión lineal y correlación de Pearson, en el cual se tomó el crecimiento de las muestras de *Candida* como variable dependiente y la concentración de propóleos como variable independiente.

6. RESULTADOS

Obtención de *Candida*

De las muestras obtenidas a partir de las distintas lesiones clínicas de candidiasis, cultivadas en placas con Medio Candida Chrom Agar, se desarrollaron colonias de *Candida* en 12 de éstas. De las placas en las que hubo desarrollo, 5 presentaron 1 colonia y 7 presentaron dos o más colonias.

Identificación de *Candida*

Según la descripción macroscópica de A. Rambach se obtuvieron los siguientes resultados: En el 100% de las muestras obtenidas se desarrolló solo una especie de *Candida* por muestra.

Tabla 1: Distribución de especies de *Candida* obtenidas

Especie de <i>Candida</i>	Porcentaje de desarrollo
<i>C. albicans</i>	91,6%
<i>C. krusei</i>	8,4%
<i>C. tropicalis</i>	0%

Para confirmar que las colonias de color malva correspondían a levaduras se realizó una tinción Gram, confirmando que los microorganismos desarrollados eran levaduras y según las especificaciones del medio de cultivo selectivo usado correspondían a *Candida krusei*.

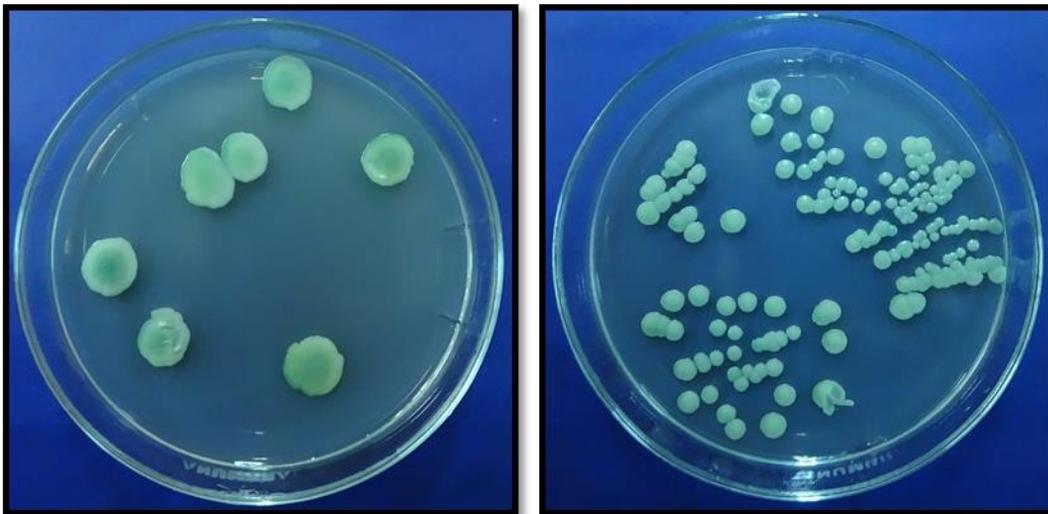


Fig. 5: Colonias de *C. albicans* obtenidas.

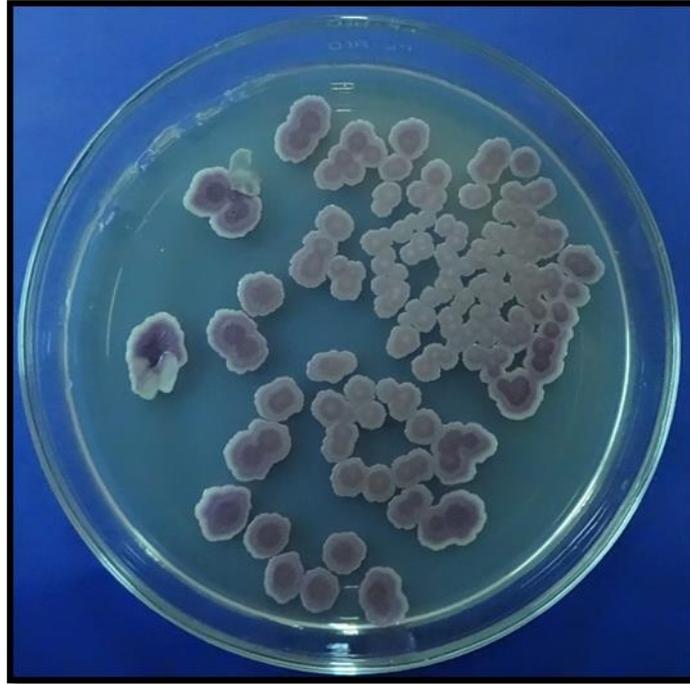


Fig.6: Colonias de *C. krusei* obtenidas.

Determinación de la MFC de propóleos frente a *Candida*

La MFC de propóleos se registró como el valor de la menor dilución que eliminó completamente el desarrollo de *Candida*. El desarrollo de una sola colonia fue considerado positivo.

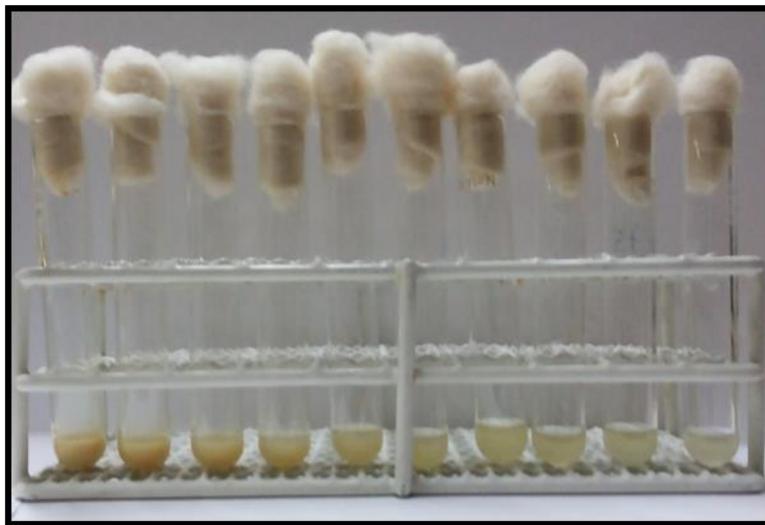


Fig. 7: Antibiograma realizado por cada colonia seleccionada.

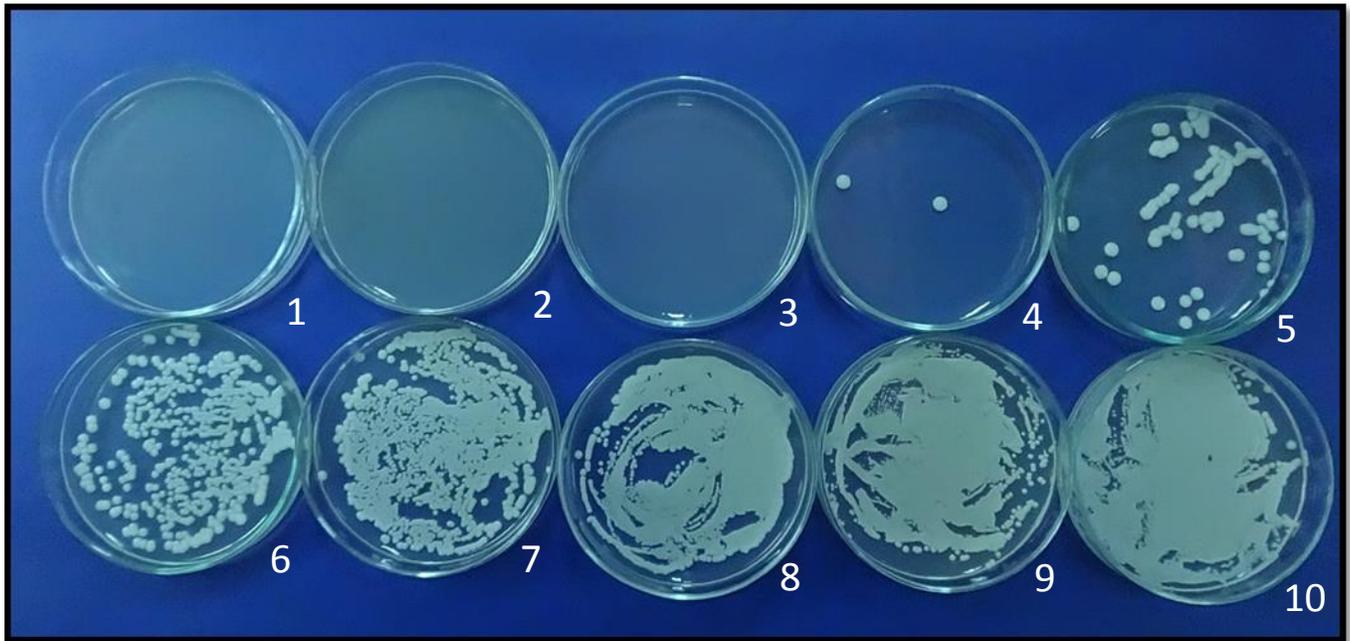


Fig.8: Placas de Agar Sabouraud sembradas a partir de cada uno de los tubos de un antibiograma, de *Candida* con distintas concentraciones de propóleos. Placa 1 = concentración de 12mg/mL de propóleos y desde 2 hasta 9, diluciones a la mitad. Placa 10 = control sin propóleos.

De las 19 colonias seleccionadas, se realizaron 19 antibiogramas y se sembraron 190 placas con medio de cultivo Agar Dextrosa Sabouraud (Fig. 7 y 8). Obteniendo los siguientes resultados:

Tabla 2: Desarrollo de colonias de *Candida* a diferentes concentraciones de propóleos, en Agar Sabouraud. Determinación de la MFC.

Colonias	Concentración de Propóleos (mg/mL)									Control sin propóleos
	12	6	3	1,5	0,75	0,375	0,1875l	0,09375	0,046875	
1	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
2	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
2'	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
3	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
3'	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
4	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
5	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
6	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
6'	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
7	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
8	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
8'	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
9	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
9'	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
10	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
10'	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
11'	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
12	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+: Desarrollo de 1 o más colonias

-: Ausencia de desarrollo de colonias

A partir de la tabla 2 se puede apreciar que el rango de acción de las concentraciones de propóleos va desde 12mg/L a 0,75mg/mL

Tabla 3: Porcentaje de colonias de *Candida* con y sin desarrollo a diferentes concentraciones de propóleos.

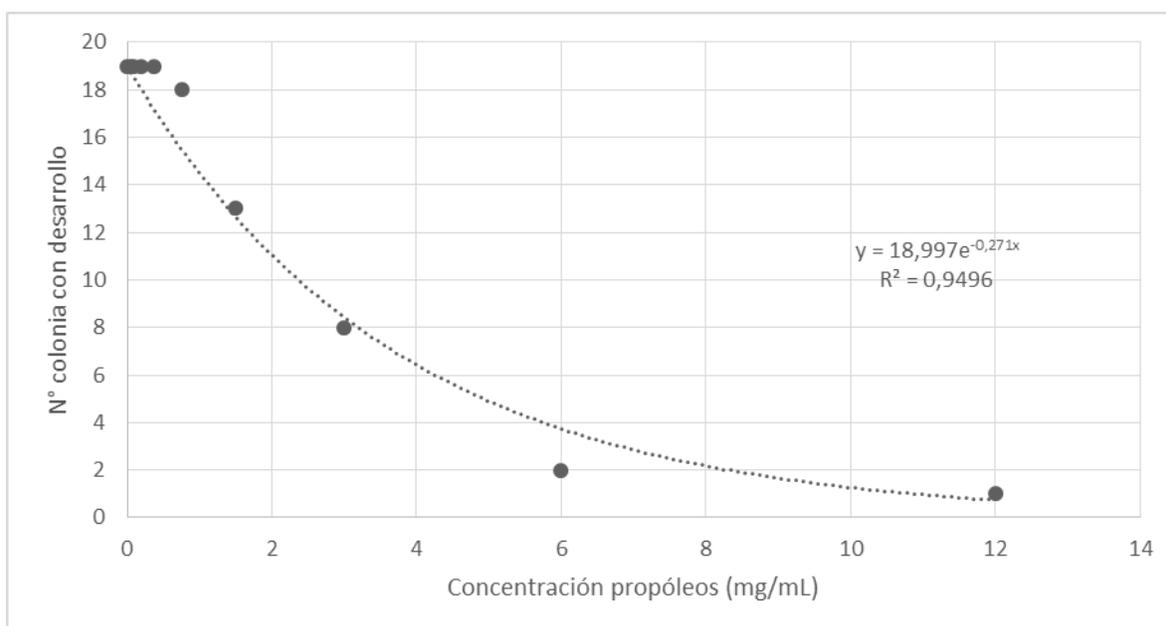
Colonias %	Concentración de Propóleos (mg/mL)									Control
	12	6	3	1,5	0,75	0,375	0,1875l	0,09375	0,046875	
Muerte	94,74	89,47	57,89	31,58	5,26	0	0	0	0	0
Sobrevida	5,26	10,53	42,11	68,42	94,74	100	100	100	100	100

De acuerdo a los resultados presentados en las tablas 2 y 3, se observó que en los controles sin propóleos hubo desarrollo normal de las colonias.

La concentración de propóleos de 12mg/mL correspondió a la MFC de un 94,74% de las colonias desarrolladas; la concentración de 6mg/mL correspondió a la MFC de un 89,47% y la concentración de 3mg/mL fue MFC para un 57,89%.

El efecto de las diferentes concentraciones de propóleos frente a *Candida* está expresado como puntos de dispersión en el grafico 1.

Grafico 1: Línea de tendencia entre el número de aislados de *Candida* desarrollados en relación a las diferentes concentraciones de propóleos.



El coeficiente de correlación de Pearson (r) obtenido para estos datos fue de $r = -0,9745$, indicando una relación inversa alta entre la variable dependiente (crecimiento colonias de *Candida*) y la variable independiente (concentración de propóleos). A su vez el coeficiente de determinación ($r^2 = 0,9496$), igual a 94,96% indicó que la variación en el desarrollo de *Candida* podría explicarse fuertemente por la variación en la concentración de propóleos.

Determinación del efecto del alcohol sobre el desarrollo de *Candida*

El efecto de la concentración de alcohol para diluir el propóleo utilizado en el antibiograma sobre el crecimiento de 3 colonias diferentes de *Candida*, fue negativo, ya que hubo desarrollo de *Candida* en el 100% de los tubos.

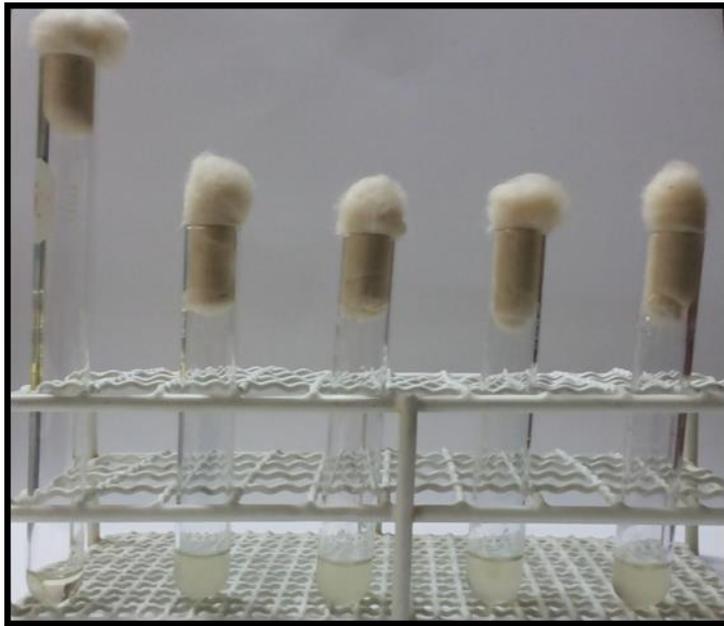


Fig.9: Control realizado con alcohol a la concentración utilizada en antibiograma.

7. DISCUSIÓN

En relación a la toma de muestras en nuestro estudio nos enfocamos en pacientes portadores de prótesis de acrílico que cubren gran parte de la mucosa oral. Los 20 pacientes participantes presentaban manifestaciones clínicas de candidiasis oral específicamente estomatitis subprotésica. De estos pacientes un 60% presentaron crecimiento fúngico en sus muestras, dentro de estas el 91,6% corresponde a *C. albicans* y el 8,4% restante corresponde a *C. Krusei* (tabla 1).

Los resultados mostrados concuerdan con los estudios de Saag MS *et al* ⁽⁵⁴⁾ los cuales encontraron que *C. albicans* fue el patógeno más frecuente encontrado, en forma solitaria en un 62% y en combinación con otras especies de *Candida* en un 31 %. Por otro lado, McMullan-Vogel CG *et al* ⁽⁴⁴⁾ encontraron que el 70% de los pacientes con signos clínicos de estomatitis subprotésica exhibían un crecimiento fúngico; siendo la *C. albicans* la especie aislada con mayor frecuencia (75%).

Con respecto a la determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (MIC) y de la Concentración Fungicida Mínima (MFC) del propóleo, este trabajo de investigación permitió comprobar *in vitro* que el propóleo chileno marca Apiherbal ® de la V Región de Valparaíso, tiene actividad antifúngica sobre las distintas especies de *Candida* como *C. albicans* y *C.krusei*.

Mediante el método utilizado se determinó que una concentración de 12 mg/mL correspondió a la MFC para el 94,74% de las colonias, a una concentración de 6 mg/mL correspondió a la MFC para el 89,46% de las colonias y 3 mg/mL fue MFC para el 57,89% de las colonias. Siendo el rango de concentración de propóleos en que hubo inhibición de crecimiento de 12 mg/mL hasta 0,75 mg/mL. El análisis estadístico realizado muestra una relación inversa alta entre las concentraciones de propóleos probado y el crecimiento de colonias de *Candida*. En relación a los resultados obtenido vemos que existe una coincidencia con respecto a que hay un efecto del propóleo sobre el microorganismo estudiando tal cual señalan los estudio de María Quinteros *et al* ⁽⁵⁰⁾, Ota *et al* ⁽⁴⁶⁾ y Marielsa Gil *et al* ⁽²²⁾, los cuales afirman que la *Candida* es sensible a este producto.

Los resultados obtenidos de MFC en este trabajo están en el mismo rango con los obtenido en el estudio de Ota *et al* ⁽⁴⁶⁾ titulado “Antifungal activity of propolis on different species of *Candida*” el cual señala que la concentración inhibitoria mínima se encuentra en una rango de 3 mg/mL a 7 mg/mL. Estudios realizados en diferentes partes del mundo donde se estudió la actividad biocida del propóleo se encontró una MIC frente a *C. albicans* en el rango de 0,2 mg/mL a 12 mg/mL ^(28, 47, 57.) La MIC obtenida por el estudio mexicano de María Quinteros *et al* ⁽⁵⁰⁾ que utilizo el mismo método al estilo antibiograma y la posterior siembra en placas fue de 0,8 mg/mL para *C. albicans*.

Entre los factores que pueden influir para obtener resultados tan variables entre los propóleos obtenidos de diferentes países esta la composición química del propóleos, la que está íntimamente relacionada con el origen botánico utilizado por las abejas para la fabricación del propóleos y a su vez relacionada con el área geográfica y con las condiciones climáticas del mismo. Existía la posibilidad de obtener resultados negativos tal como sucedió en los estudios de Alves E. *et al*⁽¹⁾ y Dantas A. *et al*⁽⁹⁾, los cuales tuvieron una actividad antifúngica nula sobre el complejo *C. albicans* atribuyendo esto a la ubicación geográfica de donde obtuvieron los extractos de propóleos.

En el estudio en el que se comparan los métodos *in vitro* que se utilizan para analizar la actividad de los extractos de propóleos contra especies de *Candida* desarrollado por Sawaya A. *et al*⁽⁵⁷⁾ muestra que la concentración promedio para todos los métodos *in vitro* estudiados estuvo en el rango de 6mg/mL a 12 mg/mL, siendo la dilución en placas de agar el que mostró los resultados más claros.

La completa ausencia de colonias desarrolladas en las placas, fue considerada como MFC, sin importar el número ni el tamaño de la colonia. Dentro de la etapa experimental de este trabajo se obtuvo más de una placa en las que se desarrolló una sola colonia de menor o igual (\leq) a 1 mm de diámetro. A diferencia de otros estudios^(12,22) en los cuales se consideraba la MFC hasta la presencia de 1 colonia en la placa.

Ota *et al*⁽⁴⁶⁾ y Marielsa Gil *et al*⁽²²⁾ demostraron que existen distintas sensibilidades al propóleos en las distintas especies de *Candida*, sin embargo en nuestro trabajo no se pudo realizar una comparación de sensibilidad de las diferentes especies debido a que solo se desarrolló una placa con *C. krusei*, siendo un número insuficiente para realizar un análisis estadístico.

Dentro de la fase experimental nos encontramos con una colonia que fue resistente completamente a las concentraciones de propóleos utilizadas, al realizar una revisión de la fichas completadas por cada paciente, pudimos comprobar que el paciente al que corresponde la colonia resistente había estado bajo tratamiento antimicótico reiteradas veces años anteriores, pudiendo existir relación con la resistencia generada. Por otro lado en las fichas de los pacientes se muestra que ninguno es consumidor de propóleos de manera regular por lo cual la resistencia mostrada a este producto, no tiene relación con el consumo previo de propóleos.

En la mayoría de los estudios que se han realizado con extracto de propóleos diluido en alcohol, se ha utilizado alcohol al 70%. Debido a la planificación de nuestro trabajo experimental en el que se realizó una dilución inicial de propóleos con alcohol de melaza, que luego sería nuevamente diluida al crear el tubo maestro para los antibiogramas es que se utilizó alcohol al 96%. En el tubo inicial en el que se realizó la dilución del propóleos el alcohol estaba a una concentración del 96% y posteriormente en el tubo maestro (1 mL de la dilución de propóleos más 9 mL de caldo) quedo finalmente con una concentración de alcohol de 9,6 %, con esta concentración se inició el

antibiograma la cual se fue disminuyendo el conjunto con el propóleos. Por lo cual la alta concentración inicial del alcohol de melaza no es determinante en los resultados obtenidos del estudio.

En este trabajo, se quiso determinar la Concentración inhibitoria Mínima (MIC) del propóleos ensayado, sobre *Candida*, pero se tuvo que determinar la actividad fungicida, ya que la observación de inhibición del crecimiento en los antibiogramas era imposible, por el aspecto lechoso que adquirieron los tubos de Caldo Nutricio. Es por ello que se decidió sembrar de cada uno de esos tubos y determinar cuál era el punto de muerte del microorganismo, y así determinar la Concentración Fungicida Mínima (MFC).

No encontramos antecedentes como estos en la literatura, o no se mencionan, ya que María Quinteros *et al* ⁽⁵⁰⁾ realizaron la siembra de placas de agar a partir de los tubos del antibiograma, pero no mencionan el probable problema de la turbidez preexistente en los tubos.

La concentración fungicida mínima que se encontró en este estudio, está dentro del rango terapéutico siendo este de 5mg por kilo para uso oral en humanos. Por lo cual la concentración sería segura para poder estudiar de manera *in vivo*, sumado a esto, las reacciones adversas al utilizar el propóleos son bajas ^(3,32,35).

Además es importante recordar que la cavidad oral tiene condiciones de temperatura, humedad, saliva, presencia de variados microorganismo que podrían influir en el efecto de este producto, por lo cual es interesante que esto sea considerado en futuros estudios de manera de abrir las puertas al estudio *in vivo* de este producto natural.

8. CONCLUSIONES

1. De las 20 muestras obtenidas de los pacientes con lesiones clínicas compatibles con candidiasis oral, 12 de estas presentaron crecimiento de colonias en las placas con medio de cultivo selectivo Candida Chrom Agar. Se logró identificar mediante la clasificación macroscópica de A. Rambach y se obtuvo que un 91,6% correspondió a *C. albicans* y un 8,4% a *C. krusei*
2. Se pudo determinar que una concentración de 12 mg/mL correspondió a la Concentración Fungicida Mínima (MFC) para el 94,74% de las colonias, a una concentración de 6 mg/mL correspondió a la MFC para el 89,46% de las colonias y 3 mg/mL fue MFC para el 57,89% de las colonias. Existe un amplio rango de concentración de propóleos en que las especies de *Candida* son sensible, va desde 12mg/mL hasta 0,75 mg/mL. Se pudo establecer una relación inversa alta entre la concentración de propóleos y el desarrollo de colonias de *Candida*. Por otro lado, el alcohol utilizado en bajas concentraciones no posee efectos antifúngicos sobre las cepas del microorganismo estudiado. Por todo esto hemos probado, el propóleos Apiherbal® proveniente de la V Región de Chile tiene la propiedad de inhibir e impedir el crecimiento *in vitro* de las especies de *C. albicans* y *C. krusei*.

9. RESUMEN

La candidiasis es la micosis de mayor frecuencia en la cavidad oral, siendo el hongo del género *Candida* el más prevalente en estas lesiones. La infección de la mucosa se produce en presencia de una predisposición local, general manifiesta o ambas. Se ha puesto especial atención a las indicaciones médicas de un producto natural, denominado propóleos. Es un compuesto elaborado por abejas productoras de miel (*Apis mellifera*) a partir de la resina y exudado de varias plantas, posee actividad antibacteriana, antiviral, antiparasitaria y antifúngica. El objetivo de este estudio es determinar *in vitro* la actividad antimicótica de propóleos chileno Apiherbal®, frente a distintas especies de *Candida* orales, utilizando el método de la Concentración Inhibitoria Mínima (MIC). En el presente estudio se tomaron 20 muestras de lesiones clínicas de candidiasis oral, se realizó la identificación de las especies, y se realizó la determinación de la MFC mediante el método de antibiograma, y el posterior sembrado en placas. La concentración inicial de propóleos utilizada en el antibiograma es 12 mg/mL a partir de la cual se comenzaron las diluciones. Los resultados obtenidos fueron que a 12 mg/L fue MFC para un 94,74% de las colonias desarrolladas; a la concentración de 6 mg/mL fue MFC para 89,47% y 3 mg/mL fue para 57,89%. Se concluye que el propóleos Apiherbal® tiene la propiedad de eliminar el crecimiento *in vitro* de las especies *C. albicans* y *C. krusei*, existiendo una relación inversa alta entre la concentración de propóleos y el desarrollo de colonias del microorganismo.

10.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alves E, Guzmán D, Figueroa J, Tello J, Scoaris D. Caracterización antimicrobiana y fisicoquímica de propóleos de *Apis mellifera*. (Hymenoptera: apidae) de la Región andina colombiana. Acta Biol.Colomb 2011;16(1):175-184.
2. Amoros M, Lurton E, Boustic J., *et al.* Comparison of the anti-herpes simplex virus activities of propolis and 3-methyl-but-enyl caffeate. J Nat Prod 1994;57:644-47.
3. Asís M. Apiterapia para todos. Científico-técnica. 1993.
4. Bankova VS, L. De Castro S, Marcucci MC. "Propolis: recent advances in chemistry and plant origin," Apidologie 2000;31(1):3-15.
5. Brassart D, Woltz A, Golliard M, Neeser JR. *In vitro* inhibition of adhesion of *Candida albicans* clinical isolates to human buccal epithelial cells by Fuca1@2Galb-bearing complex carbohydrates. Infect Immun 1991;59:1605-13.
6. Brushi ML, Franco SL, Gremiao MP. Application of an HPLC Method for Analysis of Propolis Extract. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies 2003;26(14):2399-409.
7. Chaillou LL. Estudio del Propóleos de Santiago del Estero. Argentina. Cienc Tecnol Aliment Campinas 2004;24(1):11-15.
8. CRANE E. History of other products from bees, The world history of beekeeping and honey hunting. Gerald Duckworth & Co Ltd; London, 1999:545-53.
9. Dantas A, Wanderley Y, Lira R, De Oliveira E, Dias R. Efeito antifúngico de tinturas de própolis e romã sobre espécies de *Candida*. Rev Cubana Estomatol 2012;49(2):99-106.
10. Darwish RM, Fares RJ, Zarga MH., *et al.* Antibacterial effect of Jordanian propolis and isolated flavonoids against human pathogenic bacteria, African Journal of Biotechnology 2010;9(36):5966-74.
11. De Campo R, Paulino N, Da Silva C., *et al.* Antihyperalgesic Effect of an Ethanolic Extract of Propolis in Mice and Rats. J Pharm Pharmacol 1998;50:1187-93.
12. Del Rio Martínez, (2006). Actividad biocida de un propolis chileno frente a *Porphyromonas gingivalis*: estudio *in vitro*. Trabajo de investigación para optar al título de cirujano dentista. Facultad de Odontología, Universidad de Chile.
13. Díaz A, Contreras E, Marti M., *et al.* Manual de Farmacología. 1986. Vol 2. Universidad de Concepción, Facultad de Ciencias Biológicas y Recursos Naturales. 43-9.
14. Díaz JC. Apiterapia hoy en Argentina y Cuba. Estación Experimental Apícola 2001;1:8-13.
15. Douglas LJ. Surface composition and adhesion of *Candida albicans*. Biochem Soc Trans 1985;13:982-4.

16. Duailibe SA, Gonçalves AG, Ahid FJ. Effect of a propolis extract on *Streptococcus mutans* counts *in vivo*, Journal of Applied Oral Science 2007;15(5):420–23.
17. Edwards JE Jr. *Candida* species. Principles and Practice of Infectious Diseases. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. 7th ed. Philadelphia, Pa: Elsevier Churchill Livingstone 2009:3225-40.
18. Espinosa I, Rojas R, Aranda W, Gamonal J. Prevalence of oral mucosal lesions in elderly people in Santiago, Chile. J Oral Pathol Med 2003; 32:571-5.
19. Fajuri M, Huerta J, Silva N. (2004). Eficacia del propóleos chileno como antimicrobiano contra microorganismos de interés en Odontología. Trabajo de Investigación para optar al título de cirujano dentista. Facultad de Odontología, Universidad de Chile.
20. Fernandez SG, Aleman E, Figueroa B., *et al.* Direct and airborne contact dermatitis from propolis in beekeepers. Contact Dermatitis 2004;50:320-21.
21. Ghisalberti EL. Propolis a Review. Bee Word 1979;60:59-84.
22. Gil M, Joya M, González L., *et al.* (2013) Efecto fungistático y fungicida del extracto etanólico de propóleos sobre especies de *Candida*.
23. Gispert E, Cantillo E, Rivero A, Padron M. Actividad anticaries de una crema dental con propóleos. Rev Cubana Estomatol 2000;37(3):166-170.
24. Gulbahar O, Ozturk G, Erdem N., *et al.* Psoriasiform contact dermatitis due to propolis in a beekeeper. Annals of Allergy, Asthma and Immunology 2005;94(4):509-11.
25. Guzmán D. (2005). Actividad antimicrobiana se propóleos frente a *Streptococcus mutans*: estudio *in vitro*. Trabajo de investigación para optar al título de cirujano dentista. Facultad de Odontología, Universidad de Chile.
26. Havsteen B. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. Pharmacology & Therapeutics 2002;96(2-3):67-202.
27. Hay KD, Greig DE. Propolis allergy: a cause of oral mucositis with ulceration. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1990;70(5):584-6.
28. Hegazi AG, El Hady FK. Egyptian propolis: 1-antimicrobial activity and chemical composition of Upper Egypt propolis. Z Naturforsch [C] 2001;56: 82-88.
29. Heo MY, Sohin J & Au W. Anti-genotoxicity of galangin as a cancer chemopreventive agent candidate. Mutat Res 2001;488:135-50.
30. Ibáñez M, Díaz B, Flores R., *et al.* Candidiasis oral y prótesis dentales. Med Oral 2010;13:97-101.
31. Ikeno K, Ikeno T, Miyazawa C. Effects of propolis on dental caries in rats. Caries Res 1991;25:347-51.
32. Investigaciones cubanas sobre el propóleo. Memorias del I Simposio sobre los Electos del Propóleo en la Salud Humana y Animal, Varadero, 25 de marzo de 1980, Ed. Consejo Científico del Instituto de Medicina Veterinaria, Matanzas, 1989

33. Ivanovska N, Dimov V, Bankova V, Popov S. Immunomodulatory action of propolis. VI. Influence of a water soluble derivative on complement activity *in vivo*. J Ethnopharmacol 1995;47:145-47.
34. Jayatilake JA, Saramanayake YH, Cheung LK, Saramanayake LP. Quantitative evaluation of tissue invasion by wild type, hyphal and SAP mutants of *Candida albicans*, and non-*albicans* *Candida* species in reconstituted human oral epithelium. J Oral Pathol Med 2006;35(8):484-91.
35. KAAL J. Natural medicine from honey bees, Apitherapy, Ed. Kaal, Amslordam, 1991.
36. Khayyal MT, el-Ghazaly MA, el-Khatib AS. Mechanisms involved in the antiinflammatory effect of propolis extract. Drugs Exp Clin Res 1993;19(5):197-203.
37. Kiderman A, Torten R, Furst A, Reinus K. Bi-lateral eosinophilic ulcers in an infant treated with propolis. Journal of Dermatological Treatment 2201;12:29-31.
38. Kolnick JR. Oral candidosis. Report of a case implicating *Candida parapsilosis* as a pathogen. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1980;50(5):411-5.
39. Kujungiev A, Tsvetkova I, Serkedjieva Yu, *et al.*, Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. J Ethnopharmacol 1999;64:235-240.
40. Liebana J. Microbiología oral. Ed. McGrall-Hill. 2002:316-324.
41. MacFaddin J.F. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria, Vol. 1, Williams and Wilkins, Baltimore 1985.
42. Mahmoud Lotfy. Biological Activity of bee propolis in Health and Disease. Asian Pac J Cancer prev 2006;7:22-31.
43. Matsushige K, Basnet P, Hase K., *et al.* Propolis protects pancreatic beta-cells against the toxicity of streptozotocin (STZ). Phytomedicine 1996;3:203-09.
44. McMullan-Vogel CG, Jude HD, Ollert MW, Vogel CW. Serotype distribution and secretory acid proteinase activity of *Candida albicans* isolated from the oral mucosa of patients with denture stomatitis. Oral Microbiol Immunol 1999;14(3):183-9.
45. Odds FC, Bernaerts R. CHROMagar Candida Medium, a new differential isolation medium for presumptive identification of clinically important *Candida* species. J. Clin. Microbiol 1994;32:1923-29.
46. Ota C, Unterkircher C, Fantinato V, Shimizu MT. Antifungal activity of propolis on different species of *Candida*. Mycoses 2001;44(9-10):375-8.
47. Palamin-Azevedo RV, Chinalli-Komesu M, Candido RC., *et al.* *Candida* sp in the oral cavity with and without lesions: maximal inhibitory dilution of propolis and periogard. Rev Microbiol 1999;30:335-341.

48. Pfaller MA, Jones RN, Messer SA, *et al.*. National surveillance of nosocomial blood stream infection due to species of *Candida* other than *Candida albicans*: frequency of occurrence and antifungal susceptibility in the SCOPE program. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1998;30:121–9.
49. Quintana J, Rodríguez O, Díaz M., *et al.* Empleo de la tintura de propóleos al 5% en la cura de heridas sépticas faciales. *Rev Cubana Estomatol* 1997;34(1):25-7.
50. Quintero-Mora ML, Londoño-Orozco A, Hernández-Hernández F *et al.*, Efecto de extractos de propóleos mexicanos de *Apis mellifera* sobre el crecimiento *in vitro* de *Candida albicans*, *Rev Iberoam Micol* 2008;25:22-26.
51. Regezzi J. *Patología Bucal*. 2º Ed. México D.F, Ed. Interamericana. 1995: 125-131.
52. Rex JH, Walsh TJ , Sobel JD., *et al.* Practice Guidelines for the Treatment of Candidiasis. *Clinical Infectious Diseases* 2000;30:662–78.
53. Rosalen PL, Koo H, Cury JA, Park YK. Efeito da propolis em rato de ssalivado dessalivado. 15a Reuniao Anual da SBPqO Res. 1998; A-074, 30.
54. Saag MS, Fessel WJ, Kaufman CA., *et al.* Treatment of fluconazole-refractory oropharyngeal candidiasis with itraconazole oral solution in HIV-positive patients. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1999;15(16):1413-7.
55. Sabouraud, R. Contribution a l'etude de la trichophytie humaine. Etude clinique, microscopique et bacteriologique sur la pluralite des trichophytons de l'homme. *Ann. Dermatol. Syphil.* 1892;3:1061-87.
56. Samaranayake LP, McFarlane W. *Oral Candidiasis*. Londres. Ed. Wright. 1990.
57. Sawaya A, Palma A, Caetano F., *et al.* Comparative study of *in vitro* methods used to analyse the activity of propolis extracts with different compositions against species of candida. *Letters in Applied Microbiology* 2002;35:203-07.
58. Simone-Finstrom, Michael; Spivak, Marla. Propolis and bee health: The natural history and significance of resin use by honey bees. *Apidologie* 2010;41(3):295–311.
59. Singh A, Verma R, Murari A., *et al.*, Oral candidiasis: An overview. *J. Oral Maxillofac. Pathol* 2014;18:81-85.
60. Sitheeqe MA, Samaranayake PL. Chronic Hyperplastic Candidosis/Candidiasis (Candidal Leucoplakia). *Crit. Rev oral Biol Med* 2003;14(4):253-267.
61. Stepanovic S, Antic N, Dakic I, Svabic-Vlahovic S. *In vitro* antimicrobial activity of propolis and synergism between propolis and antimicrobial drugs. *Microbiol Res* 2003;158:353-57.
62. The American Apitherapy Society, Inc. <http://www.apitherapy.org/>
63. Thomson W. "Propolis." *Medical Journal of Australia* 1990;153:654-662
64. Toreti VC, Sato HH, Pastore GM., *et al.* Recent Progress of Propolis for Its Biological and Chemical Compositions and Its Botanical Origin. *Evid. Based Complement. Alternat. Med* 2013;2013:125-37.

65. Ugur A, Arslan T. "An in vitro study on antimicrobial activity of propolis from Mugla Province of Turkey," *Journal of Medicinal Food* 2004;7(1):90–94.
66. Walsh TJ, Dixon DM, *Deep Mycoses, Medical Microbiology*, 4th edición, Texas, eds. Baron's, 1996. Univ of Texas Medical Branch.

11. ANEXOS

1. Ficha Pacientes

- Nombre: _____
- RUT: _____
- Edad: _____
- Género: ___ F ___

- Zona de toma de muestra: _____

- ¿Ha consumido propóleos de manera regular anteriormente?
Sí: _____ No: _____

- Si la respuesta es positiva ¿En qué presentación comercial?

- ¿Ha estado en tratamiento con algún antimicótico para candidiasis oral?

2. Consentimiento Informado

Actividad antimicótica de un Propóleo chileno frente a distintas especies de *Cándida*.

Este estudio se desarrollará en las dependencias de la Facultad de Odontología de la Universidad Mayor, se seleccionaran pacientes que presenten lesión clínica de Candidiasis Oral.

Se procederá a realizar la toma de muestra en la cual se realizara un raspaje de la lesión clínica de candidiasis con un algodón embebido en suero fisiológico, la cual será refrigerada para su posterior procesamiento. Para así poder determinar cuál es la concentración de propóleos capaz de inhibir el crecimiento de las distintas especies de *Candida*.

Esta toma de muestras será realizada por los encargados del estudio, Carla Cecilia Pacasse y Sebastián Ladrón de Guevara Soto.

Yo (Nombre y apellidos)

.....
.....

RUT:.....

He leído la hoja de información que se me ha entregado.

He podido hacer preguntas sobre el estudio.

He recibido suficiente información sobre el estudio.

He hablado con: Carla Cecilia Pacasse, Sebastián Ladrón de Guevara Soto.

Comprendo que mi participación es voluntaria.

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio.

.....

.....

Firma del Paciente

Firma Investigadores

