

# Susceptibilidad de Cepas de *Candida* Oral a Extracto Etanólico del Propóleo Chileno de Olmué

Susceptibility of Oral *Candida* Strains to Ethanol Extract of Chilean Propolis of Olmué

Natalia Maureira<sup>1</sup>; Paulina Viera<sup>1</sup>; Alejandra Fernandez<sup>1,2,3</sup>; Madelein Urrejola<sup>1,2</sup>;  
Cristian Bravo<sup>1</sup>; Francisca Mardones<sup>1</sup>; Enrique D. Vines<sup>4</sup> & Ziyad S. Haidar<sup>5,6,7</sup>

MAUREIRA, N.; VIERA, P.; FERNANDEZ, A.; URREJOLA, M.; BRAVO, C.; MARDONES, F.; VINES, E. D. & HAIDAR, Z. S. Susceptibilidad de cepas de *Candida* oral a extracto etanólico del propóleo chileno de Olmué. *Int. J. Odontostomat.*, 11(3):295-303, 2017.

**RESUMEN:** La infección por *Candida albicans* en la mucosa oral es conocida como Candidiasis oral (CO) y se diagnostica por el reconocimiento de cambios clínicos y la presencia de pseudohifas, hifas o levaduras en muestras obtenidas por citología exfoliativa o biopsia. Los agentes farmacológicos tópicos clásicos para el tratamiento de CO son Nistatina y Miconazol. Sin embargo, a pesar de las distintas terapias contra CO, existen formas de *Candida* resistentes al tratamiento convencional. El objetivo de este estudio fue determinar la susceptibilidad *in vitro* de *Candida* spp. a un extracto etanólico de propóleo de Olmué. Se realizó un estudio experimental descriptivo *in vitro* en donde se evaluó el efecto que presenta el uso de extracto etanólico de propóleo como antifúngico sobre cepas de *Candida* spp. obtenidas de la cavidad oral (mucosa palatina) de 31 individuos, con candidiasis oral diagnosticados con estomatitis subprotésica. El propóleo chileno utilizado fue obtenido de la zona geográfica de Olmué, quinta región. Se encontró que el 100 % de las muestras en rangos de concentración de propóleo de 0,1 µg/mL y 1,6 µg/mL presentaron un grado de inhibición en el crecimiento de *Candida* Oral y por otra parte el extracto etanólico de propóleo que generó inhibición en la mayor cantidad de muestras fue al 0,4 µg/mL (41,94 % de las muestras) y en segundo lugar la concentración al 0,2 µg/mL (35 % de las muestras). Se concluyó que el extracto etanólico de propóleo chileno obtenido de la zona de Olmué presenta la capacidad de inhibir el crecimiento de *Candida* spp. en agar Sabouraud *in vitro* de forma dosis dependiente.

**PALABRAS CLAVE:** Propóleo, *Candida albicans*, cavidad oral.

## INTRODUCCIÓN

La *Candida* es un microorganismo oportunista clasificado dentro del grupo de levaduras, de los cuales se han identificado más de 150 especies. En los seres humanos es parte de la flora comensal de piel, tracto gastrointestinal y genitourinario, entre otras (Moosazadeh *et al.*, 2016). Esta especie de levaduras es la más encontrada en la cavidad oral presentándose en el 80 % de individuos sanos (Colombo *et al.*, 2013), incluso su prevalencia aumenta en niños, adultos jóvenes y pacientes hospitalizados (Stoopler & Sollecito, 2014). Esto se debe a que la *Candida* aumenta su proliferación cuando se pierde el equilibrio de las condiciones locales de la boca.

La infección por *Candida albicans* en la mucosa oral es conocida como Candidiasis oral (CO) y se diagnostica por el reconocimiento de cambios clínicos y la presencia de pseudohifas, hifas o levaduras en muestras obtenidas por citología exfoliativa o biopsia (Lewis *et al.*, 2014). La CO se presenta principalmente como lesiones blancas o eritematosas. La CO de aspecto blanquecino incluye a la candidiasis pseudomembranosa y a la candidiasis hiperplásica crónica. La candidiasis de aspecto eritematosos incluye a la candidiasis atrófica crónica, candidiasis atrófica aguda, glositis romboidal media y queilitis an-

<sup>1</sup> Facultad de Odontología, Universidad Andrés Bello, Santiago, Chile.

<sup>2</sup> BioMAT'X, Universidad de los Andes, Santiago, Chile.

<sup>3</sup> Programa de Doctorado en BioMedicina, Facultad de Medicina, Universidad de los Andes, Santiago, Chile.

<sup>4</sup> Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad Andrés Bello, Santiago, Chile.

<sup>5</sup> Facultad de Odontología, Universidad de los Andes, Santiago, Chile.

<sup>6</sup> Plan de Mejoramiento Institucional (PMI) en Innovación I+D+i, Universidad de los Andes, Santiago, Chile.

<sup>7</sup> Centro de Investigación Biomédica, Universidad de los Andes, Santiago, Chile.

gular. La candidiasis atrófica crónica es el tipo más frecuente de todas las CO y es conocida como candidiasis subprotésica, debido a que se presenta en la mucosa oral que se encuentra en contacto con la superficie de alguna prótesis removible. Clínicamente se observa un área eritematosa y se ubica en el paladar y reborde alveolar (Millsop *et al.*, 2016). La clasificación de Newton descrita el año 1962, permite identificar el grado de estomatitis subprotésica, de acuerdo a 3 variedades clínicas (Ceballos Salobreña & Delgado Azareño, 1996) (Fig. 1).

La candidiasis sub-protésica puede causar ardor oral y faríngeo, aumento de la sensibilidad interfiriendo en la alimentación, alteración del gusto y olfato, disfagia, odinofagia (Gall *et al.*, 2013), aumento de volumen en la mucosa oral interfiriendo en la estética y en la estabilidad del uso de prótesis removible, conduciendo a alterar la calidad de vida de los individuos infectados (Moosazadeh *et al.*). Incluso, la presencia de CO se ha asociado a lesiones potencialmente malignas y cáncer oral (Hamdy *et al.*, 2016). Es por estos motivos que el tratamiento de la CO resulta imprescindible.

El tratamiento de la candidiasis oral consiste en el manejo de los factores predisponentes locales y

sistémicos, en conjunto con el manejo farmacológico mediante agentes tópicos debido a que la infección por *Cándida* es de carácter superficial (Tobudic *et al.*, 2012). Los agentes farmacológicos tópicos clásicos para el tratamiento de CO son Nistatina y Miconazol. Sin embargo, a pesar de las distintas terapias contra CO, existen formas de *Candida* resistentes al tratamiento convencional, debido a la prescripción descontrolada de los antimicóticos (Martins *et al.*, 2009). Es por tal motivo que se han propuesto alternativas terapéuticas naturales al tratamiento convencional (García-Cuesta *et al.*, 2014). La ventaja del uso de terapéuticos naturales en el tratamiento de la CO es que se encuentran disponibles en variados alimentos y plantas, por lo que su uso, adicionalmente estaría aportando con vitaminas y reduciendo los efectos tóxicos de los fármacos convencionales (García-Cuesta *et al.*; Machorowska-Pieniazek *et al.*, 2016).

En el área de la odontología el propóleo ha sido recomendado como terapia natural para mantener la higiene oral (Niedzielska *et al.*, 2016), como antiséptico intracanal (Prabhakar *et al.*, 2015), para desinfección cavitaria (AkhavanKarbassi *et al.*, 2016), para el tratamiento de mucositis oral (Herrera *et al.*, 2010), debido a que presenta propiedades antimicrobianas - Figure 2. Sin embargo, a pesar de las investigaciones del uso del propóleo en la cavidad oral, se necesitan más estudios para su indicación en terapias orales (Espinoza *et al.*, 2003).

El objetivo de este estudio fue determinar la susceptibilidad *in vitro* de *Candida* spp. a un extracto etanólico de propóleo de Olmué.

## MATERIAL Y MÉTODO

Se diseñó un estudio experimental *in vitro*. El estudio fue aprobado por el comité de bioética, folio 037 año 2015, Facultad de Odontología, Universidad Andrés Bello. En la Figure 3 se observa el diagrama de flujo del experimento.

La población de interés correspondió a los pacientes de la Clínica Odontológica de la Facultad de Odontología de la Universidad Andrés Bello, sede Viña del Mar. La subpoblación de estudio fueron los individuos diagnosticados de Candidiasis Sub-protésica, entre mayo de 2014 y marzo de 2015. Los in-

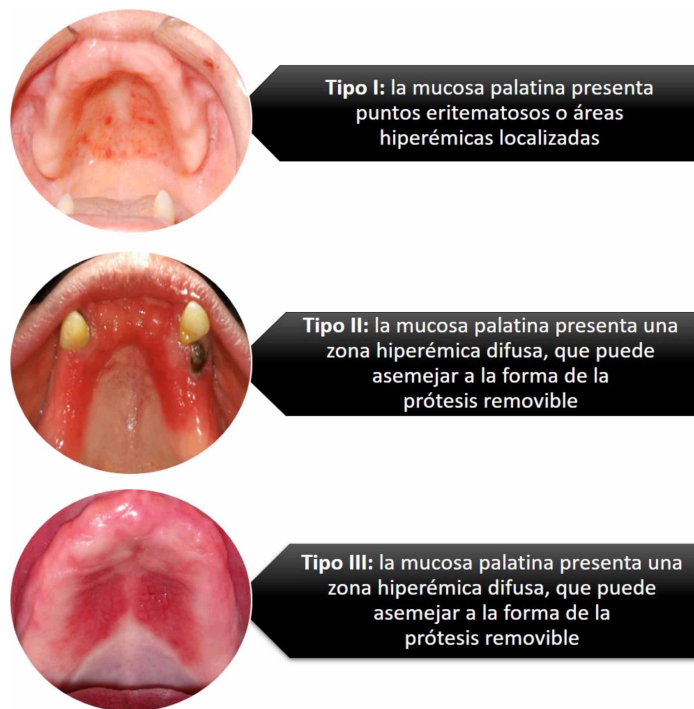


Fig. 1. Variedades clínicas de Newton (Imágenes - Servicio de Histopatología, Facultad de Odontología, Universidad Andrés Bello).

# Propóleo o Própolis

Beneficios, Propiedades, Usos y Aplicaciones

¿es bueno para la salud?

- Anti-microbianos
- Anti-bacteriano
- Anti-fúngicos
- Anti-virulento
- Bactericida / Bacteriostática

Cavidad dental y posterior extracción dental  
Gingivitis

- Trata enfermedades óseas e induce regeneración ósea
- Reduce el colesterol y la presión arterial
- Trata alergias y intoxicación alimentaria
- Mata las células cancerosas
- Trata las verrugas y el herpes
- Trata el estrés cardíaco
- Antihistamínico
- Hemostático



Fig. 2. Beneficios del propóleo.

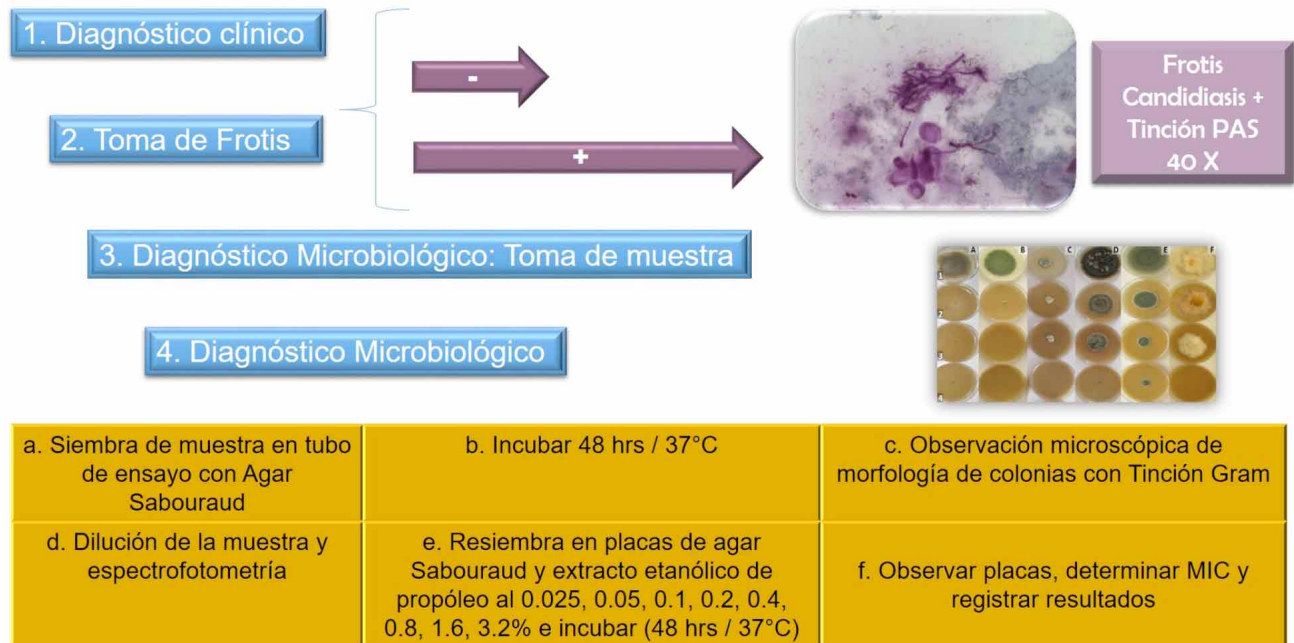


Fig. 3. Diagrama de flujo del Experimento. El diagrama de flujo indica los pasos para realizar el experimento. El diagnóstico de candidiasis oral se realiza principalmente a través de la observación clínica de las lesiones. A pesar de la estrecha relación entre la presencia de estomatitis sub-protésica y candidiasis palatina, es recomendable confirmar la presencia de *Candida* spp., para esto se realizan procedimientos de laboratorio como la observación microscópica de frotis o el cultivo de las muestras en medio Sabouraud (Williams & Lewis, 2011).



dividuos elegibles que cumplieron con los criterios de inclusión y que accedieron de forma voluntaria a participar, se les explicó el estudio de forma oral y escrita y se les entregó un consentimiento informado, el cual firmaron. Los criterios de inclusión correspondieron a individuos mayores de 18 años, portadores de prótesis removible superior parcial o total, diagnosticados clínicamente con estomatitis sub-protésico y positivos al frotis para *Candida* spp. Los criterios de exclusión correspondieron a individuos en terapia antimicótica tópica en la cavidad oral y sistémica, en terapia con colutorios antisépticos tales como clorhexidina al 0,12 %, en individuos en tratamiento con corticoides tópicos como uso de inhalador con corticoides y mujeres embarazada y en periodo de lactancia.

Los individuos fueron seleccionados de manera aleatoria simple. De un total de 66 individuos con diagnóstico clínico y microbiológico de candidiasis sub-protésica, se incluyeron 31 individuos.

**Examen clínico.** Dos patólogos orales, previamente calibrados, examinaron la mucosa oral de los individuos en un sillón dental (Unit 4T, Kavo, USA), bajo luz dental (A-dec 500, A-dec, USA), utilizando un espejo dental.

**Toma de frotis oral.** Los individuos con diagnóstico clínico de candidiasis subprotésica, se les tomó una muestra palatina para confirmar su diagnóstico con un frotis. Con una gasa se eliminó el exceso de saliva en el paladar y con una espátula de madera se raspó en una dirección la mucosa palatina. La muestra fue esparcida en un portaobjetos limpio y seco, 3 veces en la misma dirección abarcando distintas áreas. Se fijó con spray, y se envió la muestra al Servicio de Histopatología de la Facultad de Odontología, Universidad Andrés Bello, para su evaluación.

**Toma de muestra.** Se tomó muestra palatina de los individuos con diagnóstico clínico de candidiasis sub-protésica y confirmada por el frotis, y que cumplieron con los criterios de inclusión y exclusión. La mucosa palatina fue limpiada con una gasa estéril y mediante una espátula de madera estéril se raspó la zona de la lesión hasta observar una muestra visible en la punta de la espátula. Se retiró el tapón de algodón del tubo de ensayo y se flameó el borde de éste bajo un mechero. Se esparció mediante la técnica de siembra en estría sobre el tubo de ensayo con agar Sabouraud tendido estéril. Se flameó nuevamente el borde del tubo de ensayo bajo el mechero y se colocó el tapón de algodón. La muestra fue en-

viada al Laboratorio de Microbiología de la Universidad Andrés Bello sede Viña del Mar.

**Preparación del extracto etanólico de propóleo al 30 %.** El propóleo chileno utilizado en la investigación fue obtenido de la zona geográfica de Olmué, en la región de Valparaíso, Chile. El período en el que fue extraído correspondió al verano del año 2014. Para la obtención del propóleo puro se mezclaron 300 gramos de propóleo con 1 litro de alcohol etílico potable al 96 % y esta mezcla se maceró por 3 semanas, a temperatura ambiente (entre 20 a 30°C) revolviendo el preparado 1 vez al día. Se filtró con mallas de nylon de 100 mesh para eliminar las impurezas del preparado. Una vez completado este proceso se obtuvo el extracto etanólico de propóleo a concentración del 30 %.

**Manipulación de las muestras.** Se realizó la resiembra de la muestra la cual se incubó a 37 °C por 48 horas. Una vez que creció la resiembra, se observó si macroscópicamente con la morfología de colonias de *Candida* spp. se tomó con un asa de punta redonda una colonia, la cual se extendió sobre un portaobjetos para realizar una tinción de Gram y se observó en el microscopio la presencia de levaduras para confirmar que las colonias correspondan a *Candida* spp. (Fig. 3).

Se tomó con un asa redonda una porción de la muestra la que se diluyó en 5 mL de cloruro de sodio al 0,09 % estéril en un tubo de ensayo estéril, se extrajeron 100 µL de esta suspensión la cual se colocó en una cubetilla con 900 µL de cloruro de sodio al 0,09 %, se colocó en el espectrofotómetro para la lectura de la muestra. A modo de estandarizar la cantidad de microorganismos en cada placa se utilizó una absorbancia de 200, es decir, una vez que se obtuvo la absorbancia de la cubetilla se diluyó la muestra que se encontró en el tubo, la cantidad necesaria para alcanzar la absorbancia establecida. Se colocó 50 µL de la suspensión en cada placa y mediante la técnica de rastrillo de con un asa de vidrio se sembró sobre la superficie del agar hasta que la suspensión se secó. Se incubó las placas con agar Sabouraud y extracto etanólico de propóleo al 0,025, 0,05, 0,1, 0,2, 0,4, 0,8, 1,6%, por 48 horas a 37 °C, se observaron las placas para observar si hubo crecimiento, para determinar la concentración inhibitoria mínima *Candida* spp., en los casos en que hubo crecimiento, en todas las placas se repitió el experimento incluyendo 2 concentraciones extra al 1,6 y 3,2 % (Fig. 3).

**VARIABLES EN ESTUDIO.** Sexo (masculino-femenino), edad (en años), tipo de prótesis removible (total, parcial), material de la prótesis removible (acrílica, metálica), clasificación de Newton (1, 2, 3), tiempo de usos de prótesis (años) crecimiento de *Candida* spp. en el agar (si muestra crecimiento-no muestra crecimiento), concentración inhibitoria mínima propóleo (CIM) ( $\mu\text{g/mL}$ ).

**ANÁLISIS ESTADÍSTICO.** Las variables cualitativas (género y crecimiento de *Candida* spp. en el agar) se representaron mediante frecuencia absoluta y relativa. Las variables continuas (edad, CIM) se representaron mediante media y desviación estándar. La relación de las variables fue mediante test chi cuadrado de Pearson y test de Fisher. Todos los cálculos fueron realizados en BioMAT'X – CIB, Universidad de los Andes, Santiago de Chile, con el Stats Direct Statistical software versión 2.8.0.

## RESULTADOS

De un total de 66 pacientes diagnosticados con candidiasis crónica eritematosa asociado a estomatitis sub-protésica, 46 pacientes fueron mujeres (69,70 %) y 20 hombres (30,30 %), en donde se seleccionaron 31 pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión y exclusión, 21 eran mujeres (67,74 %) y 10 hombres (32,26 %).

De los 31 pacientes que participaron del estudio, su distribución según edad abarca un rango etario entre los 26 y 81 años. El promedio de edad de la muestra fue de 61,84 años.

Con respecto a la clasificación de Newton para las candidiasis sub-protésicas de acuerdo a su presentación clínica se observó el mayor porcentaje en el tipo I, el cual se manifestó en 17 pacientes (54,84 %) (Tabla I).

Tabla I. Clasificación de Newton.

Clasificación de Newton	Frecuencia	Porcentaje
I	17	54,84%
II	8	25,81%
III	6	19,35%
Total	31	100,00%

Los resultados de presencia o ausencia de crecimiento de colonias de *Candida* spp. se observan en la Tabla II.

Tabla II. Presencia o ausencia de crecimiento de colonias de *Candida* spp.

CIM	Si	No
0	31	0
0,025	31	0
0,05	31	0
0,1	27	4
0,2	16	15
0,4	3	28
0,8	2	29
1,6	0	31
3,2	0	31

Con respecto a la concentración mínima inhibitoria, se pudo confirmar que el 100 % de las muestras en rangos de concentración de propóleo de 0,1  $\mu\text{g/mL}$  y 1,6  $\mu\text{g/mL}$  presentaron inhibición en su crecimiento. Mientras que en todas las muestras con concentraciones de 0,025 y 0,05  $\mu\text{g/mL}$  hubo crecimiento de la levadura, ver Tabla III. Por otra parte, se observó que la concentración de extracto etanólico de propóleo que generó inhibición en la mayor cantidad de muestras fue al 0,4  $\mu\text{g/mL}$  (41,94 % de las muestras) y en segundo lugar la concentración al 0,2  $\mu\text{g/mL}$  (35 % de las muestras). Cabe destacar que entre las muestras con concentración de 0,1  $\mu\text{g/mL}$  y 0,4  $\mu\text{g/mL}$ , ya el 90,32 % del total de las muestras se encontraba con inhibición del crecimiento de *Candida* spp. (Tabla III).

Tabla III. Concentración inhibitoria mínima.

MIC $\mu\text{g/mL}$	Frecuencia de inhibición	Frecuencia acumulada	%	% acumulado
0,1	4	4	12,90	12,90
0,2	11	15	35,48	48,38
0,4	13	28	41,94	90,32
0,8	1	29	3,23	93,55
1,6	2	31	6,45	100,00
Total	31	31	100,00	100,00

Respecto a la relación entre la presentación clínica de la candidiasis oral a través de la clasificación de Newton y la concentración mínima inhibitoria, se realizó el test estadístico de chi cuadrado de Pearson, en el cual se obtuvo como resultado un p valor de 0,059 y el de Fisher un r valor de 0,059, es decir, se considera que ambas variables son independientes (Tabla IV).

La relación entre el género y la concentración inhibitoria mínima se realizó el test estadístico de chi cuadrado de Pearson de lo que se obtuvo un r valor de 0,071 y en el test de Fisher el resultado del r valor

Tabla IV. Descripción entre clasificación de Newton y MIC.

MIC	Newton n1	%	Newton n2	%	Newton n3	%	Total	%
0,1	2	6,45	1	3,23	1	3,23	4	12,90
0,2	6	19,35	2	6,45	3	9,68	11	35,48
0,4	9	29,03	4	12,90	0	0,00	13	41,94
0,8	0	0,00	1	3,23	0	0,00	1	3,23
1,6	0	0,00	0	0,00	2	6,45	2	6,45
Total	17	54,84	8	25,81	6	19,35	31	100,0

fue de 0,052, es decir, las variables son independientes entre sí (Tabla V). Cabe destacar que de los pacientes involucrados en la investigación hubo una relación 2:1, del género femenino y masculino respectivamente. Estos resultados se relacionan con la proporción obtenida de los pacientes que, acudieron a la Universidad Andrés Bello sede Viña del Mar y que no fueron incluidos en el estudio.

Tabla V. Relación entre el sexo y MIC.

MIC	Femenino	Masculino	Total
0,1	3	1	4
0,2	10	1	11
0,4	7	6	13
0,8	1	0	1
1,6	0	2	2
TOTAL	21	10	31

Con respecto a la relación entre la edad y la concentración inhibitoria mínima se realizó el test estadístico de chi cuadrado de Pearson de lo que se obtuvo un valor de 8,46, se obtuvo un r valor de 0,7234 y al test de Fisher el r valor fue de 0,7234; es decir, las variables son independientes entre sí (Tabla VI).

Tabla VI. Relación entre la edad y MIC.

Concentración	Frecuencia	Promedio	Desviación estándar
0,1	4	65,0	12,62
0,2	11	54,9	17,01
0,4	13	65,9	8,26
0,8	1	54	0
1,6	2	71	2,83
TOTAL	31		

En base a la información obtenida respecto a la asociación entre los años de uso de la prótesis removible de los pacientes involucrados en el estudio y la concentración inhibitoria mínima obtenida se realizó el test estadístico de chi cuadrado de Pearson de lo que se obtuvo un valor de 24,46 y un r valor de 0,8726 y en el test de Fisher se obtuvo un r valor de

0,670; es decir, las variables son independientes entre sí (Tabla VII).

Tabla VII. Relación entre los años de uso de prótesis removible y MIC.

Concentración	Frecuencia	Promedio	Desviación estándar
0,1	4	5,65	9,60
0,2	11	8,38	6,96
0,4	13	10,56	8,37
0,8	1	25	0,00
1,6	2	17,50	17,68
TOTAL	31		

De acuerdo al tipo de prótesis removible usada por los pacientes incluidos en la investigación, cuya categoría se dividió en prótesis parcial o total, y la concentración inhibitoria mínima se realizó el test estadístico de chi cuadrado de Pearson de lo que se obtuvo un valor de 7,259 y un r valor de 0,122, al realizar el test de Fisher el r valor obtenido fue de 0,091, es decir, las variables son independientes entre sí (Tabla VIII).

Tabla VIII. Relación entre el tipo de prótesis removible y MIC.

Concentración	Total	Parcial	Total
0,1	4	0	4
0,2	6	5	11
0,4	12	1	13
0,8	1	0	1
1,6	1	1	2
TOTAL	24	7	31

Al estudiar la relación entre el material de la prótesis y la concentración inhibitoria mínima se realizó el test estadístico de chi cuadrado de Pearson que obtuvo un valor de 5,4611 y el r valor de 0,243, al realizar el test de Fisher el r valor obtenido fue de 0,244, es decir, las variables son independientes entre sí (Tabla IX).

Tabla IX. Relación entre el material de prótesis removible y MIC.

Concentración	Acrílica	Metálica	Total
0,1	3	1	4
0,2	10	1	11
0,4	7	6	13
0,8	1	0	1
1,6	2	0	2
TOTAL	23	8	31

## DISCUSIÓN

El presente estudio permitió demostrar que la *Candida* spp. obtenida del paladar de pacientes diagnosticados clínica y microbiológicamente con candidiasis eritematosa crónica sub-protésica, fueron susceptibles al extracto etanólico de propóleo obtenido de la zona de Olmué. Las muestras de *Candida* spp. fueron obtenidas principalmente de mujeres, en un rango entre los 50 y 60 años. Esto se puede deber a que generalmente son las mujeres las que más asisten a servicios de diagnósticos odontológicos (AL-Waili *et al.*, 2012; Lynge Pedersen *et al.*, 2015) y a que la mayor prevalencia de Candidiasis sub-protésica es en individuos sobre 50 años (AL-Waili *et al.*).

El rango de concentración inhibitoria mínima alcanzado para el propóleo obtenido de Olmué, contra *Candida* spp., en placas Petri fue de 0,1 a 1,6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Rangos en el que coincidimos con AL-Waili *et al.*, Kacániová *et al.* (2012) y Herrera *et al.*. Este resultado se puede deber a que a pesar de que los diferentes investigadores utilizamos propóleo de distintas zonas geográficas las concentraciones de flavonoides fueron similares y componente esencial en la actividad antifúngica del propóleo (Herrera *et al.*; AL-Waili *et al.*; Kacániová *et al.*). Específicamente, Herrera *et al.* determinaron la CIM en cepas de *Candida* spp. con propóleo de origen brasileño recolectado por abejas *Apis mellifera* de diferentes regiones del Brasil (sur y noreste de Brasil). AL-Waili *et al.* utilizaron propóleo recogido de Arabia Saudita (EEPS) y de Egipto (EEPE), determinaron la CIM cepas de *Candida Albicans* del Departamento de Microbiología, Unidad de Investigación de Abejas, Universidad King Saud, Riyadh. Kacániová *et al.* utilizaron cepas, aislados clínicos, que fueron suministrados por el hospital universitario de Martin (República de Eslovaquia) y el propóleo fue extraído de 2 localidades de la parte central de Eslovaquia (región de Detva).

Sin embargo, existen reportes en la literatura tales como Quintero-Mora *et al.* (2008), Haghdoost *et al.* (2016) y Tobaldini-Valerio *et al.* (2016) que difieren de nuestros resultados, ya que obtuvieron rangos de inhibición de entre 0,6 a 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 220 a 880  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 36  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectivamente. Esto podría deberse a que existieron diferencias en la preparación del propóleo y en el procedimiento de laboratorio, encontrándose distintas temperaturas, tiempo de incubación y concentración del etanol utilizado.

Existe una relación directa entre el tiempo de uso de una prótesis removible y la aparición de candidiasis. El criterio de Espinoza *et al.* indica que este fenómeno se presenta luego de 5 años de uso, tiempo que favorece el deterioro protésico y la colonización por *Candida* Spp. Es necesario tener presente que también influye en la aparición de la infección el desajuste protésico, los malos hábitos de higiene oral y períodos de baja defensa orgánica, que a medida que transcurre el tiempo hace más probable la aparición de candidiasis (Farah *et al.*, 2011).

Existe una relación directa entre el tiempo de uso de una prótesis removible y la aparición de candidiasis. El criterio de Espinoza *et al.* (Espinoza *et al.*, 2003); indica que este fenómeno se presenta luego de 5 años de uso, tiempo que favorece el deterioro protésico y la colonización por *Cándida* Spp. Es necesario tener presente que también influye en la aparición de la infección el desajuste protésico, los malos hábitos de higiene oral y períodos de baja defensa orgánica, que a medida que transcurre el tiempo hace más probable la aparición de candidiasis (Farah *et al.*).

Ahora bien, al realizar el vínculo de MIC con la clasificación clínica de Newton que aparece representado en la Tabla IV, la inhibición comenzara a los 0,1 mg/mL para todos los tipos de Newton, y en la etapa 1 se registrara el menor nivel de concentración para la inhibición total de las muestras a 0,4 mg/mL, secuencialmente seguido por tipo 2 con un 0,8 mg/mL y tipo 3 que requirió un valor de 1,6 mg/mL. Pese a que no se encontró esta asociación en la literatura, los resultados dan un indicio que, a mayor intensidad del proceso patológico, mayor es la cantidad de propóleo que se debe usar, ya sea en la concentración o en el tiempo de aplicación. Los valores de concentración inhibitoria mínima de extracto etanólico de propóleo necesario para los tres tipos de diagnósticos clínicos de candidiasis estuvieron bajo los niveles de



toxicidad establecidos por la European Food Safety Authority en el consenso del año 2010, cuyos niveles se definieron a los 2 g/Kg/día.

Los resultados del presente estudio junto con el resultado del uso del propóleo de otros países (AL-Waili *et al.*; Kacániová *et al.*), permiten indicar que el propóleo presenta propiedades antifúngicas capaz de inhibir el crecimiento de *Candida* spp. *in vitro* (Casaroto & Lara, 2010).

Dentro de las limitaciones de esta investigación se encuentra la imposibilidad de determinar con exactitud la presencia y proporción de los componentes activos del propóleo. Dentro de los componentes activos, se vincula la concentración de flavonoides con la estandarización de este antifúngico, es importante señalar que en la literatura consultada se aclara que al margen de la composición de los diferentes tipos de propóleo, a nivel mundial se mantienen las propiedades fungicidas (Casaroto & Lara; Popova *et al.*, 2013).

## CONCLUSIÓN

Se concluye que el extracto etanólico de propóleo chileno obtenido de la zona de Olmué presenta la capacidad de inhibir el crecimiento de *Candida* spp. en agar Sabouraud *in vitro* de forma dosis dependiente, alcanzado una acción fungicida de un 100 %.

**MAUREIRA, N.; VIERA, P.; FERNANDEZ, A.; URREJOLA, M.; BRAVO, C.; MARDONES, F.; VINES, E. D. & HAIDAR, Z. S.** Susceptibility of oral *Candida* strains to ethanol extract of Chilean propolis of Olmué. *Int. J. Odontostomat.*, 11(3):295-303, 2017.

**ABSTRACT:** Fungal (or yeast) infections; mycoses, occurring in the oral mucous membranes, of *Candida* species (mostly *C. albicans*, a normal component of the oral microbiota), also known as oral thrush or oral candidiasis (OC), can be diagnosed via the recognition of clinical changes and the presence of pseudohyphae, hyphae or yeasts in samples obtained by exfoliative cytology and/or biopsy. Topical pharmacological preparations and drugs such as Nystatin and Miconazole are used in the treatment of CO. However, there are forms of *Candida* with resistance to such conventional treatment approaches. Therefore, the aim of this study is to determine the *in vitro* susceptibility of *Candida* spp.; an ethanolic extract of propolis from Olmué. Hence, an experimental *in vitro* descriptive study was carried out in which the effect of an ethanolic extract of propolis used as antifungal on strains of *Candida* spp. obtained from the oral cavity

(palatine mucosa) of 31 individuals, diagnosed with OC (sub-denture stomatitis) is determined. Natural propolis was obtained from the Olmué area, in the 5th region of Chile. It was found that 100 % of the samples with propolis concentration ranging from 0.1 mg / mL to 1.6 mg / mL presented a degree of inhibition in the growth of OC. On the other hand, the ethanolic extract of propolis that generated inhibition in the largest number of samples was 0.4 mg / mL (41.94 % of the samples) followed by the concentration of 0.2 mg / mL (35 % of the samples). Therefore, it can be concluded that the ethanolic extract of Chilean propolis obtained from the Olmué area has the ability to inhibit the growth of *Candida* spp. *in vitro* in a dosage-dependent manner.

**KEY WORDS:** propolis, *Candida albicans*, oral cavity.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AkhavanKarbassi, M.; Yazdi, M. F.; Ahadian, H. & SadrAbad, M. J. Randomized doubleblind placebocontrolled trial of propolis for oral mucositis in patients receiving chemotherapy for head and neck cancer. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 17(7):3611-4, 2016.
- AL-Waili, N.; Al-Ghamdi, A.; Ansari, M. J.; 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.*, 9(9):793-800, 2012.
- Casaroto, A. R. & Lara, V. S. Phytomedicines for *Candida*-associated denture stomatitis. *Fitoterapia*, 81(5):323-8, 2010.
- Ceballos Salobreña, A. & Delgado Azareño, W. *Micosis Bucuales*. Madrid, Grupo Aula Médica, 1996. pp.144-8.
- Colombo, A. L.; Guimarães, T.; Camargo, L. F.; Richtmann, R.; Queiroz-Telles, F. D.; Salles, M. J.; Cunha, C. A.; Yasuda, M. A.; Moretti, M. L. & Nucci, M. Brazilian guidelines for the management of candidiasis - a joint meeting report of three medical societies: Sociedade Brasileira de Infectologia, Sociedade Paulista de Infectologia and Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. *Braz. J. Infect. Dis.*, 17(3):283-312, 2013.
- Espinoza, I.; Rojas, R.; Aranda, W. & Gamonal, J. Prevalence of oral mucosal lesions in elderly people in Santiago, Chile. *J. Oral Pathol. Med.*, 32(10):571-5, 2003.
- Farah, C. S.; Lynch, N. & McCullough, M. J. Oral fungal infections: an update for the general practitioner. *Aust. Dent. J.*, 55 Suppl. 1:48-54, 2010.
- Gall, F.; Colella, G.; Di Onofrio, V.; Rossiello, R.; Angelillo, I. F. & Liguori, G. *Candida* spp. in oral cancer and oral precancerous lesions. *New Microbiol.*, 36(3):283-8, 2013.
- García-Cuesta, C.; Sarrion-Pérez, M. G. & Bagán, J. V. Current treatment of oral candidiasis: A literature review. *J. Clin. Exp. Dent.*, 6(5):e576-82, 2014.
- Haghdooost, N.; Salehi, T. Z.; Khosravi, A. & Sharifzadeh, A. Antifungal activity and influence of propolis against germ tube formation as a critical virulence attribute by clinical isolates of *Candida albicans*. *J. Mycol. Med.*, 26(4):298-305, 2016.
- Hamdy, R. F.; Zaoutis, T. E. & Seo, S. K. Antifungal stewardship considerations for adults and pediatrics. *Virulence*, 2:1-15, 2016.
- Herrera, C. L.; Alvear, M.; Barrientos, L.; Montenegro, G. & Salazar, L. The antifungal effect of six commercial extracts of Chilean propolis on *Candida* spp. *Cienc. Investig. Agrar.*, 37(1):75-84, 2010.



- Kacániiová, M.; Vukovic, N.; Chlebo, R.; Hascík, P.; Rovná, K.; Cubon, J.; Dzuga, M. & Pasternakiewicz, A. The antimicrobial activity of honey, bee pollen loads and beeswax from Slovakia. *Arch. Biol. Sci.*, 64(3):927-34, 2012.
- Lewis, M. The role of antifungal and antiviral agents in primary dental care. *Prim. Dent. J.*, 3(4):59-64, 2014.
- Lynge Pedersen, A. M.; Nauntofte, B.; Smidt, D. & Torpet, L. A. Oral mucosal lesions in older people: relation to salivary secretion, systemic diseases and medications. *Oral Dis.* 21(6):721-9, 2015.
- Machorowska-Pieniazek, A.; Skucha-Nowak, M.; Mertas, A.; Tanasiewicz, M.; Niedzielska, I.; Morawiec, T. & Baron, S. Effects of brazilian propolis on dental plaque and gingiva in patients with oral cleft malformation treated with multibracket and removable appliances: A comparative study. *Evid. Based Complement. Altern. Med.*, 2016: 2038407, 2016.
- Martins, C. V.; da Silva, D. L.; Neres, A. T.; Magalhães, T. F.; Watanabe, G. A.; Modolo, L. V.; Sabino, A. A.; de Fátima, A. & de Resende, M. A. Curcumin as a promising antifungal of clinical interest. *J. Antimicrob. Chemother.*, 63(2):337-9, 2009.
- Millsop, J. W. & Fazel, N. Oral candidiasis. *Clin. Dermatol.*, 34(4):487-94, 2016.
- Moosazadeh, M.; Akbari, M.; Tabrizi, R.; Ghorbani, A.; Golkari, A. & Banakar, M. Denture stomatitis and *Candida Albicans* in Iranian population: A systematic review and meta-analysis. *J. Dent. (Shiraz)*, 17(3 Suppl.):283-92, 2016.
- Niedzielska, I.; Puszczewicz, Z.; Mertas, A.; Niedzielski, D.; Rózanowski, B.; Baron, S.; Konopka, T.; Machorowska-Pieniazek, A.; Skucha-Nowak, M.; Tanasiewicz, M.; Paluch, J.; Markowski, J.; Orzechowska-Wylegaa, B.; Król, W. & Morawiec, T. The influence of ethanolic extract of Brazilian green propolis gel on hygiene and oral microbiota in patients after mandible fractures. *Biomed. Res. Int.*, 2016:9190814, 2016.
- Popova, M.; Dimitrova, R.; Al-Lawati, H.; Tsvetkova, I.; Najdenski, H. & Bankova, V. Omani propolis: chemical profiling, antibacterial activity and new propolis plant sources. *Chem. Cent. J.*, 7(1):158, 2013.
- Prabhakar, A. Karuna, Y. M.; Yavagal, C. & Deepak, B. M. Cavity disinfection in minimally invasive dentistry - comparative evaluation of Aloe vera and propolis: A randomized clinical trial. *Contemp. Clin. Dent.*, 6(Suppl. 1):S24-31, 2015.
- Quintero-Mora, M. L.; Londoño-Orozco, A.; Hernández-Hernández, F.; Manzano-Gayosso, P.; López-Martínez, R.; Soto-Zárate, C. I.; Carrillo-Miranda, L.; Penieres-Carrillo, G.; García-Tovar, C. G. & Cruz-Sánchez, T. A. Effect of Mexican propolis extracts from *Apis mellifera* on *Candida albicans* *in vitro* growth. *Rev. Iberoam. Micol.*, 25(1):22-6, 2008.
- Stoopler, E. T. & Sollecito, T. P. Oral mucosal diseases: evaluation and management. *Med. Clin. North Am.*, 98(6):1323-52, 2014.
- Tobaldini-Valerio, F. K.; Bonfim-Mendonça, P. S.; Rosseto, H. C.; Bruschi, M. L.; Henriques, M.; Negri, M.; Silva, S. & Svidzinski, T. I. Propolis: a potential natural product to fight *Candida* species infections. *Future Microbiol.*, 11:1035-46, 2016.
- Tobudic, S.; Kratzer, C.; Lassnigg, A. & Presterl, E. Antifungal susceptibility of *Candida albicans* in biofilms. *Mycoses*, 55(3):199-204, 2012.
- Williams, D. & Lewis, M. Pathogenesis and treatment of oral candidosis. *J. Oral Microbiol.*, 3:5771, 2011.

Dirección para correspondencia:

Prof. Dr. Ziyad S. Haidar,  
DDS, Cert Implantol., MSc OMFS, FRCS(Canada), FACS,  
MBA, PhD.  
Professor and Scientific Director  
Faculty of Dentistry  
Universidad de Los Andes  
Mons. Álvaro del Portillo 12.455  
Las Condes  
Santiago  
CHILE

E-mail: zhaidar@uandes.cl

Recibido : 12-05-2017

Aceptado: 30-06-2017