

## ELIMINACIÓN DE *CANDIDA ALBICANS* CON EXTRACTO ETANÓLICO DE PROPÓLEO COMERCIAL DE *apis mellifera* DEL ESTADO MÉRIDA, EN BASES DE PRÓTESIS PARCIALES REMOVIBLES.

Aurelys García\* • Adriana Ucar\*\* • Lelis Ballester\*\*\*

\*Postgrado de Rehabilitación Bucal.

\*\* Clínica Integral del Adulto III. Facultad de Odontología.\*\*\* Laboratorio de Análisis Microbiológico de Medicamentos. Facultad de farmacia. y Bioanálisis. Universidad de Los Andes.

Mérida, Venezuela. E-mail: aurelysgarcia2@gmail.com

### RESUMEN

*Candida albicans* es un microorganismo que se encuentra formando parte de la microflora normal de la cavidad bucal; sin embargo, cuando un paciente es portador de prótesis dentales removibles (PDR), la cantidad de levaduras de *C. albicans* se ve aumentada debido a las porosidades propias del material de las prótesis facilitando la adherencia del microorganismo a ellas; por lo que la higiene bucal del paciente se hace es un factor fundamental para mantener saludables las estructuras de soporte. Los extractos etanólicos de propóleo (EEP) poseen actividad antifúngica contra *C. albicans* debido a los componentes bioactivos que se han encontrado en ellos. El objetivo de esta investigación fue determinar la efectividad de los EEP comerciales en el estado Mérida, para la eliminación de *C. albicans* en muestras de resina acrílicas duras de PDR. Se probaron EEP de diferentes proporciones (20%, 30%, 40%). Se realizaron dos pruebas: la desinfección de las muestras de acrílico sumergidas en los diferentes EEP por 5min, 10min, 15min, 20min y 8 h, posteriormente se realizó la difusión de agar con porcillo para determinar los halos de inhibición. Se encontró en un primer tiempo que en las placas de *Petri* se presentó crecimiento de *C. albicans* solamente en el control; en segundo tiempo de difusión en agar, el EEP al 20% formó el halo de inhibición de menor tamaño, los EEP al 30% y 40% produjeron halos inhibitorios de forma irregular y se evidenciaron crecimiento de *C. albicans* a partir de 24 h. Se encontró la efectividad de EEP en la inhibición de *C. albicans* con 5min de inmersión de las muestras de PPR. Los EEP al 20% mostraron una inhibición del crecimiento de *C. albicans* y al 30% y 40% tuvieron actividad antifúngica de tipo fungicida frente al *C. albicans*.

**Palabras clave:** desinfección de Prótesis Parciales Removibles, Extracto Etanólico de Propóleos, *Candida albicans*.

## ELIMINATION OF *CANDIDA ALBICANS* WITH ETHANOLIC EXTRACT OF COMERCIALPROPOLEUM OF *APIS MELLIFERA* FROM MÉRIDA STATE ON HARD BASIS OF REMOVABLE PARTIAL DENTURES

### ABSTRACT

*Candida albicans* is a microorganism being part of the normal microflora of the mouth, however, when a patient wears removable partial dentures (RPD) the amount of *C. albicans* yeast

increases because of the dentures material porosity enhancing the attachment of microorganism being for which patient's oral hygiene is a basic factor for maintaining supporting structures healthy. The propolis ethanolic extracts (PEE) are characterized by an antifungal activity against *C. albicans* due to their bioactive components. The goal of the present research was to determine the effectiveness of commercial PEE in Mérida State for the elimination of *C. albicans* in hard acrylic resin samples of RPD. Different PEE proportions were tested. Two tests were performed: disinfection of the acrylic samples submerged into different PEE for 5, 10, 15 and 20 minutes and 8 hours; later the agar diffusion to determine the halos of inhibitions. In a first time it was found that in petri dishes showed growing of *C. albicans* just in the controls; in the second period agar diffusion the PEE at 20% generated a smaller inhibition of halo, PEE at 30% and 40% generated irregular shape inhibitory halos and *C. albicans* growing was observed after 24 hours. Effectiveness of PEE for the inhibition of *C. albicans* after 5 minutes of samples immersion. The PEE at 20% showed inhibition of *C. albicans* growing at 30% and 40% they exhibited antifungal activity towards *C. albicans*.

**Key words:** removable partial dentures disinfection, ethanol extract of propolis, *Candida albicans*.

---

## Introducción

*Apis mellifera* es reconocida como el insecto más valioso desde el punto de vista económico; esta reputación se debe en parte a que produce miel y cera de abejas, pero la principal utilidad de la abeja melífera es su papel en la polinización de cultivos. Entre estos cultivos están los de nueces, hortalizas, vegetales forrajeros y de plantas no cultivadas. La clave para entender el éxito de esta abeja mielera, es reconocer que esta subespecie una vez traída de Europa en la época de la colonia, evolucionó en el trópico, logrando mejor desenvolvimiento en estos hábitats tropicales; a pesar de tener un comportamiento defensivo muy pronunciado estas abejas tienen muy buena reputación como productoras de miel (1,2). No obstante, las razones de peso para diferenciarlas de las abejas europeas están basadas en adaptación al clima, distribución del alimento y gran número de depredadores naturales, los cuales han tenido un gran impacto sobre las abejas tropicales, particularmente en la evolución de un comportamiento excesivamente

defensivo y altas tasas de abandono de las colmenas y enjambrazón, que han hecho que su manejo sea muy difícil dentro de la actividad apícola (3).

Los productos realizados en la colmena son conocidos desde hace muchos años, entre ellos: la apitoxina, (veneno de las abejas), la cera, la jalea real, la miel, el polen, el panal y el propóleo (4).

El propóleo, es una resina cerosa de origen netamente apícola, de composición compleja y con una apariencia física variable, que las abejas elaboran y utilizan para la construcción, reparación, aislamiento y protección de la colmena (4,5).

El nombre propóleo se deriva de "pro" (delante de), y de "polis" (ciudad en el idioma griego), el nombre de própolis, significa defensor de la ciudad, entendiéndose la colmena como una ciudad. Su uso se ha mantenido durante siglos hasta llegar a nuestros días, en que se están realizando investigaciones científicas sobre el empleo de preparados a base de

propóleos en los campos de la biología y en la medicina tanto humana como veterinaria (4,6).

La composición química del propóleo es muy variada y va a estar determinada por la flora del área geográfica, los microorganismos presentes en el entorno geográfico, los factores climatológicos, la especie de la abeja que lo produce y la zona de la colmena donde va a ser utilizado el producto. Esto le da a cada propóleo composiciones únicas, ya que ningún lugar de la tierra es exactamente igual en flora y clima (7).

Investigadores de diferentes países han realizado estudios para caracterizar la composición de los propóleos producidos en Chile (5), en Argentina (8), en Irán (9) y en Venezuela (10). Cada uno de estos investigadores han encontrado compuestos en común para todos los propóleos y compuestos que los diferencian entre sí, proporcionalmente características únicas a cada uno de ellos. Situación que hace muy difícil la estandarización de los compuestos de propóleo; incluso el color son diferentes entre sí, pueden ser ocre, rojo, pardo, marrón claro y verdes; así mismo, la consistencia puede ser friable, firmes, gomosos y elásticos (5).

En los propóleos se han aislados más de 180 compuestos. Los principales componentes son resinas y bálsamos que contienen flavonoides y ácidos fenólicos o sus esteres y contenidos muy variables de cera, aceites volátiles, polen e impurezas. En pequeñas cantidades contienen también, terpenos, taninos, restos de secreción de glándulas salivares de las abejas (4). Sin embargo, los flavonoides (encargados de las propiedades bactericidas, fungicidas y antivirales) y los compuestos fenólicos (encargados de la actividad antitumoral), son los compuestos bioactivos más importantes del producto (8).

Actualmente son muchos los efectos que se le atribuyen al propóleo tales como: antiinflamatorios, inmunoestimulantes, hepatoprotectores, carcinoestático, antimicrobianos, antivirales, antifúngicos, antiprotozoarios,

anestésicos y de regeneración tisular (4).

En cuanto al efecto antifúngico, el propóleo muestra diferentes grados, frente a los diferentes microorganismos o levaduras, como *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Ascospaera apis* y *Plasmopara viticola*. En el género *Candida*, el efecto del propóleo depende del tipo de levaduras, siendo más efectivo en *C. albicans* y menos efectivo *C. guilliermondii* (4). El diluyente del propóleo también influye en su actividad antifúngica siendo el etanol el diluyente por excelencia (11).

En el campo odontológico son muchas las implicaciones que tiene el propóleo: actividad anticariogénica, anestésica, antiinflamatoria, antimicrobiana, cicatrizante (estas tres últimas muy importantes en periodoncia), desinfección y limpieza de conductos radiculares (en endodoncia), entre otros (12).

El EEP o tintura de propóleo se prepara como extractos alcohólicos de propóleos en proporciones variables entre 10% y 30% (en peso/volumen). Se mezcla la cantidad de propóleos con el volumen adecuado de etanol al 70°. Se tienen en maceración durante siete días como mínimo, agitando con frecuencia y filtrando con un filtro de poro fino. El EEP se envasa en frascos de color ámbar, protegidos de la luz y se almacena a temperatura ambiente, para evitar la oxidación de los componentes del propóleo (13).

*Candida albicans* es un hongo microscópico, patógeno y oportunista, causante de procesos infecciosos importantes en la cavidad bucal, entre ellos la estomatitis subprotésica, la cual es frecuente, observar en pacientes portadores de PPR, donde el tejido epitelial que se encuentra en contacto con las mismas, se observa generalmente adelgazado y el tejido conjuntivo presenta inflamación excesiva. La proliferación de *Candida albicans* y su adherencia al PPR se relaciona con el inicio, mantenimiento y agravamiento de la estomatitis subprotésica (14).

*Candida albicans* es encontrada en la cavidad oral en proporciones de 25% a 50% en individuos sanos, tanto adultos y niños, En pacientes portadores de PPR, estos valores aumentan de 60% a 100%. *Candida albicans* es la especie más común y representa al menos el 70% de los microorganismos aislados en los portadores de dentaduras (15).

En el proceso de desinfección se eliminan los agentes patógenos reconocidos, pero no necesariamente todas las formas de vida microbianas. Esto se debe a que los niveles de desinfección, van desde una esterilización química aplicada únicamente a objetos inanimados y los desinfectantes germicidas aplicados sobre tejidos objetos y superficies.

La desinfección deja las superficies correspondientes con ninguna o con la menor cantidad posible de gérmenes que causan enfermedad (16).

Se han realizado algunos estudios en los cuales se prueban distintos agentes, para lograr la desinfección efectiva de las PPR (17, 18, 19, 20, 21).

El simple hecho de portar prótesis dentales, ya sea totales o parciales, es un factor predisponente para la colonización, de los tejidos de soporte por *Candida albicans*. Se crea un ambiente cerrado más anaerobio, entre prótesis dental colocada en boca y la mucosa. Se favorece el crecimiento de *Candida albicans* pudiendo pasar de ser un hongo comensal de la mucosa a invadir la misma (22).

Las PPR generalmente están formadas en su totalidad o en buena parte por resina de polimetilmetacrilato. Sobre dicho sustrato, *Candida albicans* es capaz de generar una matriz extracelular diferente a la que se genera sobre otra superficie, esta forma de crecimiento se llama biofilm. Si además la superficie de la resina es rugosa o tiene una elevada porosidad, favorece la acumulación de residuos y la aparición de la enfermedad. Las prótesis dentales rebasadas con materiales blandos, presentan el mismo problema, aún en mayor grado por la

facilidad de deterioro de dichos materiales. La utilización de algunos agentes químicos para su limpieza a veces favorecen el deterioro del material de rebase y no previenen el crecimiento de *Candida albicans* (22).

La fase inicial de la adhesión de *Candida albicans* a la resina acrílica es mediada por factores no específicos (hidrofobicidad superficial y fuerzas electrostáticas), y por componentes de la pared celular (monoproteínas y proteínas fibrilares) que actúan como adhesinas y reconocen receptores en células epiteliales, matriz extracelular y superficies colonizadas por *Streptococos* sp de la cavidad bucal. Una vez adherido el microorganismo esa se reproduce, desarrollando la formación de biopelícula que crece en forma de blastoconidias, pseudohifas e hifas verdaderas; las cuales pueden guiar su crecimiento a través de contacto por las discontinuidades de las células de la mucosa bucal, penetrar entre ellas, invadir tejidos profundos y dificultar la fagocitosis. En un estudio realizado por Romo et al (14) se determinó que la forma en la que *C. albicans* se adhiere a la superficie de polimetilmetacrilato de la base de prótesis, es diferente de acuerdo a la técnica empleada en la elaboración de la base (termopolimerizado, autopolimerizado y polimerizado con microondas).

Son muchos los estudios que se han realizado acerca del efecto antifúngico que el EEP ejerce sobre *Candida albicans* resultando en efectos satisfactorios en la totalidad de ellos (23, 24, 25, 26, 27). La utilización del EEP como desinfectante de PPR no ha sido descrito hasta el momento en la literatura científica publicada, por lo que este trabajo de investigación puede ser un aporte valioso; por lo que el objetivo general de este estudio fue determinar la efectividad de los extractos etanólicos de propóleos comerciales del estado Mérida para la eliminación de *Candida albicans* en muestras de resina acrílicas duras de PPR.

## Materiales y métodos

Los experimentos se realizaron en el Laboratorio de Análisis Microbiológico de Medicamentos de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, Mérida – estado Mérida, Venezuela.

Se escogieron tres EEP de *Apis mellifera* provenientes del estado Mérida: Abeja Maya 20% (Escagüey); Miel Vital 30%, (Los Araques), Granja Las Nieves 40%, (Manzano Alto), los cuales son procesados de forma artesanal por los apicultores de la zona andina en el estado Mérida, Venezuela.

Se realizó una prueba piloto, la cual se ejecutó de la siguiente manera: Se confeccionaron 40 muestras de acrílico de termocurado (Veracril) de tamaño 25 x 25 mm y de 3mm de grosor aproximadamente.

Las 40 muestras de acrílico fueron colocadas en un envase de vidrio conteniendo 150 ml de agua destilada y llevadas al autoclave a 121°C por 20min para su esterilización.

Posteriormente las muestras de resina acrílica fueron separadas en 4 grupos de 10 muestras cada uno. Cada grupo fue identificado con letras de la siguiente manera:

- A: Agua destilada (grupo control).
- B: EEP al 20%
- C: EEP al 30%
- D: EEP al 40%

Se rotularon 4 envases de vidrio para cada grupo, conteniendo cada uno de ellos 100 ml, uno con una letra correspondiente al grupo, los cuales contenían 100 ml de Caldo Sabourand Dextrosa y 2ml del cultivo de *Candida albicans*. Posteriormente y en cada envase rotulado, se sumergieron 10 muestras de resina acrílica y se incubaron a 37° C por 48 horas, con la finalidad de promover el crecimiento de la cepa.

Posteriormente, y en cuatro nuevos envases de vidrio rotulados para cada grupo, se colocaron EEP al 20%, al 30% y al 40% y en otros el agua destilada para el grupo control, dentro de una campana de microflujo laminar. Al completarse el tiempo de incubación se removieron las muestras de acrílico contaminadas y se sumergieron en los 4 nuevos envases de vidrio correspondientes (EEP al 20%, al 30% y 40%).

Con un cronómetro se fueron midiendo los tiempos (5min, 10min, 15min, 20min, 8h) y al cumplirse cada lapso de tiempo se extrajeron dos muestras de acrílico y se colocaron en envases de vidrio de boca ancha que contenían Caldo Sabourand Dextrosa los cuales fueron identificados con la letra del grupo y el periodo de tiempo al cual pertenecía formando subgrupos.

Los tiempos de inmersión fueron elegidos tal y como lo describe la prueba de coeficiente fenólico, la cual se hace para probar las propiedades biocidas de una sustancia basándose en la capacidad biocida del fenol (28).

Inmediatamente que las muestras de resina acrílica fueron extraídas del EEP, estas se colocaron en el caldo Caldo Sabourand Dextrosa, las cuales fueron incubadas a 37°C por 48 h.

Los resultados de la prueba piloto al entrar en contacto con el caldo, el medio de cultivo se tornó turbio. Siendo mayor la turbidez en las muestras de los grupos B y D. Aunque las muestras del grupo C no se tornaron turbias al instante, su turbidez fue aumentando con el paso de los minutos.

Posteriormente, una vez cumplido el periodo de incubación, se revisaron cada uno de los envases. La presencia de turbidez en los medios de cultivo tipo caldo fue indicativo de crecimiento del microorganismo. Sin embargo, al existir una turbidez inicial en los caldos, la turbidez no fue indicativa de crecimiento de la cepa.

Los resultados observados en la prueba piloto permitió modificar la metodología realizándose dos pruebas, que se describen a continuación:

### **Prueba de desinfección sobre resina acrílica**

Se tomaron 20 muestras de resina acrílica de termocurado (Veracril) duras de tamaño 25 x 25 mm y de 3 mm de grosor aproximadamente.

Las muestras fueron colocadas en un envase de vidrio con 150 ml de agua destilada y llevadas al autoclave a 121° C por 20 minutos para ser esterilizadas.

Posteriormente estas muestras fueron sumergidas en un envase de vidrio conteniendo 100 ml de Caldo Sabouraud Dextrosa y 2 ml del cultivo de *Candida albicans*, con el fin de contaminar las muestras, y fueron incubadas en incubadoras graduadas a 37° C por 24 h, para promover el crecimiento de la cepa.

Se colocaron los EEP y el agua destilada (grupo control) en cuatro envases de vidrio, identificados con la letra del grupo correspondiente. Para este procedimiento se utilizó una campana de microflujo laminar.

Las muestras de resinas acrílicas se removieron del envase de vidrio que contenía la levadura e inmediatamente fueron sumergidas en cada uno de los frascos con los EEP y agua destilada.

En cada envase de vidrio con EEP y agua destilada se colocaron cinco muestras de resina acrílica.

Con un cronómetro se fueron midiendo los tiempos (5min, 10min, 15min, 20min, 8h) y al cumplirse cada lapso de tiempo, se extrajo una muestra de resina acrílica y se colocó en el centro de una cápsula de Petri.

El agar fue fundido y mantenido a una temperatura entre 40-50°C. Luego las muestras fueron cubiertas con Agar Sabourand Dextrosa. Las muestras fueron divididas en subgrupos. Cada subgrupo contenía una muestra de resi-

nas acrílicas identificadas con la letra del grupo correspondiente (A,B,C,D) y con el tiempo de inmersión de la muestra en los EEP y el agua destilada (5min, 10min, 15min, 20min, 8h). Se esperó a que el agar gelificara.

Las placas se incubaron a 37°C por 24 - 48 h. Se observaron las muestras a las 24 h y 48 h de incubación.

Los datos fueron registrados en cuadros. Se calificó con un “+” si existía crecimiento de *Candida albicans* y con un “-” si no existía crecimiento.

### **Prueba de difusión en agar con técnica de pocillo**

Se tomaron cuatro tubos de ensayo de 100 X 10 mm de tamaño con tapa de bakelita y se colocaron en cada uno 15 ml de Agar Sabourand Dextrosa fundido y conservados (45°C – 50°C). Luego se agregaron en cada uno de los tubos 1ml del cultivo de *Candida albicans*, agitándolos posteriormente.

El contenido fue colocado en cápsulas de Petri de y se dejaron gelificar. Con un sacabocado metálico previamente calentado se perforó el agar. Con un asa metálica se extrajo el trozo del agar de 1cm de diámetro ubicado en el centro de la cápsula de Petri.

Los pocillos se llenaron con 0.2 ml de cada una de las concentraciones correspondientes del EEP y con el agua destilada (grupo control). Cada una de las placas se incubó a 37°C por 24 y 48 h.

Para la obtención de los resultados se midieron los halos de inhibición en cada una de las placas a las 24 y 48 h de incubación. Los halos fueron medidos desde un extremo de halo pasando por el centro del pocillo hasta el borde opuesto del halo. En el caso de los halos irregulares se tomó la medida de la parte más regular, aun cuando no pase por el centro del pocillo. Los datos fueron registrados en cuadros diseñados para tal fin.

## Resultados

Prueba de desinfección sobre el acrílico (24 y 48 h)

No se evidenció crecimiento en ninguna de las cápsulas de Petri, excepto en las del grupo control, como se demuestra en la tabla 1. Esto indica que las tres concentraciones ensayadas, ejercieron un efecto antifúngico en los diferentes tiempos de exposición (5min, 10min, 15min, 20min, 8 h).

Tiempos de inmersión	24 Horas				48 Horas			
	A Control	B EEP 20%	C EEP 30%	D EEP 40%	A Control	B EEP 20%	C EEP 30%	D EEP 40%
5 min	+	-	-	-	+	-	-	-
10 min	+	-	-	-	+	-	-	-
15 min	+	-	-	-	+	-	-	-
20 min	+	-	-	-	+	-	-	-
8 h	+	-	-	-	+	-	-	-

**Tabla 1.** Resultados del crecimiento de *Candida albicans* a las 24 y 48 h de incubación.

Fuente Propia

## Prueba de difusión en agar con técnica de pocillo (24 y 48 h)

Tanto a las 24 como a las 48 h los resultados fueron los mismos

- Grupo A (control): Agua destilada
  - No hubo halo de inhibición.
- Grupo B (EEP 20%):
  - Halo de inhibición de 2,7 cm, siendo este halo de bordes bien definidos y forma regular.
  - No se observó desarrollo de la cepa dentro del halo de inhibición.
- Grupo C (EEP 30%):
  - Halo inhibición de 4,5 cm, su forma irregular y bordes poco definidos a las 24 h. A las 48 h los

bordes se mostraron un poco mas definidos

- Se observó desarrollo de colonias de *Candida albicans* dentro del halo.
- Grupo D (EEP 40%):
  - Halo de inhibición de 5 cm de diámetro, bordes indefinidos y forma irregular a las 24 h. A las 48 h los bordes se hicieron más definidos.
  - Se evidenció crecimiento de colonias de *Candida albicans* dentro del halo.

## Discusión

El propósito de este estudio fue determinar y comparar la efectividad en la eliminación de *Candida albicans* por algunos extractos etanólicos de propóleos EEP comerciales de distintas concentraciones (20%, 30%, 40%) de *Apis mellifera* extraídos y procesados en distintas zonas del estado Mérida contra *Candida albicans* en bases duras de PPR.

En el estudio piloto se sumergieron las muestras de resina acrílica, por los tiempos determinados (5min. 10min. 15min. 20min. 8 h), en envases con los distintos EEP. El objetivo de sumergir las PPR en desinfectante es lograr la completa destrucción de los microorganismos, ya que la inmersión acelera el proceso de desnaturalización de las proteínas (18).

Cuando las muestras de resina acrílica fueron embebidas en propóleo y posteriormente colocadas en los envases con el medio de cultivo tipo caldo, el medio se tiñó y se volvió turbio, por lo que fue imposible determinar el crecimiento o no de *Candida albicans*. Hay coincidencia al afirmar que con los medios en caldos no se puede evaluar si existe o no crecimiento de una cepa, cuando se usa propóleo, ya que en el caldo se observa turbidez como indicador de

desarrollo, y el propóleo colorea el caldo, siendo imposible observar si existe o no crecimiento de la cepa (25,30 31). Por esta razón, luego de realizar un experimento utilizando un medio de cultivo tipo caldo y propóleo, se debe proceder a sembrar las muestras en placas de Petri usando para ello un medio en agar, para observar si hay o no crecimiento de la cepa. El método con agar es más efectivo para la evaluación de la efectividad del propóleo sobre *Candida albicans*, debido a la baja solubilidad que presentan los componentes del propóleo en el agar.

La prueba de difusión en agar con la técnica de pocillo, permitió medir los halos de inhibición producidos por los distintos EEP utilizados en la investigación, así como también permitió observar que tipo de actividad antifúngica presenta el propóleo frente a *Candida albicans*.

Los resultados obtenidos en el primer experimento señalan que los EEP son efectivos para inhibir *Candida albicans* de las superficies de las prótesis removibles, por no observarse ningún crecimiento en las placas donde se sembró, determinándose que solo se requieren 5 min de inmersión; este resultado coincide con otros estudios (24, 25, 32, 33); sin embargo Herrera et al (24). Sin embargo, el estudio de Dos santos et al (34), tuvo resultados distintos a esta investigación.

En la segunda prueba de la investigación, donde se midieron y compararon los halos inhibitorios de las diferentes concentraciones de los EEP, se encontró que los EEP al 20% (grupo B) mantuvieron un tamaño de 2.7 cm de diámetro, su forma fue regular y sus bordes bien definidos tanto a las 24 como a las 48 h, no evidenciándose crecimiento de la cepa dentro del halo.

Los EEP al 30% (grupo C) presentaron un halo de inhibición a las 24 h de 4.5 cm, el cual se mantuvo a las 48 h y los EEP 40% (grupo D) presentaron un halo de inhibición a las

24 h y 48 h de 5 cm. Los halos de inhibición de los grupos C y D tuvieron forma irregular, lo cual se debe a una difusión desigual del EEP en el agar. En cuanto a los bordes de los halos estos fueron poco definidos a las 24 h, pero a las 48 h los bordes se hicieron un poco más definidos. Observándose crecimiento de la cepa dentro de los halos de inhibición de los grupos C y D.

El análisis de los diferentes halos inhibitorios sugieren que la actividad antifúngica de los EEP frente a *Candida albicans*, es de tipo fungistático, ya que la cepa logró crecer dentro de los halos de inhibición, sobre todo durante las primeras 24 h, en las concentraciones de 30 y 40% utilizadas en la investigación.

Estos resultados evidencian la relación directa de la concentración del propóleo con el crecimiento de la cepa, a partir de las 24 h, ya que a mayor concentración del EEP (30% y 40%), fue mayor el desarrollo de la cepa. Es por esto, que se puede presumir que a mayor concentración exista la presencia de mayor cantidad de nutrientes propios del propóleo, que favorezcan el desarrollo de la cepa de *Candida albicans*.

En Venezuela los propóleos se conocen muy poco, fueron caracterizados en 1993 con técnicas que para el momento no permitieron identificar gran cantidad de componentes. Esto explica porque actualmente no se conoce la composición real y exacta de los propóleos venezolanos; lo cual representa dos problemas: 1) la falta de disponibilidad, ya que este producto de la colmena aún no es recolectado, ni fabricado de forma metódica por los apicultores que los producen. 2) su utilización exclusiva en medicamentos artesanales de poca difusión, por la dificultad de industrializar un producto desconocido (10).

En cuanto a la composición de los EEP debe ser considerada la concentración y cantidad de etanol aplicada durante la extracción y procesamiento de los EEP. A mayor concentra-

ción de etanol, los EEP serán mucho más efectivos como desinfectantes de prótesis, como se evidencia en esta investigación.

Se ha sugerido que el tipo de solvente utilizado para la extracción del propóleo también puede influir en su calidad, debido a su interacción con las diferentes clases de sustancias presentes en ellos, lo cual determina la composición del EEP (30). Igualmente se afirma que la sensibilidad mostrada por *Candida albicans* hacia los EEP, son en gran parte debido al contenido de alcohol que poseen. (35)

Las diferencias encontradas en las actividades biológicas de diversos EEP se debe a su composición química, ya que provienen de diferentes regiones geográficas; sin embargo también podría estar influyendo la época de recolección del propóleo, la especie de la abeja y el método de preparación de la tintura (25), así como también los métodos de extracción y de control de calidad usados por cada fabricante (25, 32).

Los propóleos deben tener un aroma, color y sabor característico dependiendo del origen botánico, el cual también determina que su consistencia pueda ser maleable o rígida. Puede apreciarse que por lo menos debe contener 35% de componentes solubles en etanol y un máximo de 25% de cera, además de los requisitos para cenizas, los fenoles totales, los flavonoides, la humedad y el índice de oxidación (36).

Tanto en la recolección como en el procesado y envasado del producto deben aplicarse rigurosas normas de higiene para evitar la contaminación y la subsiguiente pérdida de la calidad del producto (4, 23).

El mal envasado de los productos puede llegar a ser un factor importante en la conservación de la calidad de estos. Los EEP deben ser envasados en frascos ámbar o de polietileno que no permitan el paso de la luz, ya que esta puede llegar a oxidar los principales componentes bioactivos (13,37).

En esta investigación el EEP al 40% presentó un envase inadecuado. Mientras que el EEP al 30% nunca presentó el mismo color, ni consistencia, en todos los frascos que se usaron para realizar la investigación. Pudiendo correlacionarse con los resultados obtenidos, ya que fueron las EEP menos efectivos, influyendo en esto su inadecuado procesamiento y almacenaje en la efectividad inhibitoria de *Candida albicans*

En Venezuela en el año 1984, se elaboraron las normas de calidad de miel de abejas COVENIN 2136-84 y COVENIN 2191-84, las cuales entraron en etapa de revisión en el año 2005, proceso coordinado por la Comisión Técnica de Alimentos en Fondonorma, con la participación de las autoridades sanitarias y de producción, las Universidades y los apicultores. Si bien, el polen apícola y el propóleo también se comercializan en Venezuela, estos productos de la colmena aún no están normados; por este motivo, se utilizan los reglamentos técnicos de Brasil como referencia para los criterios de calidad que deben seguir estos productos (36).

Las múltiples y variadas propiedades beneficiosas para la salud que presentan los propóleos dependen de sus componentes. Esto justifica la necesidad de una correcta evaluación de su calidad, y si bien distintos países disponen de parámetros oficiales para dicha evaluación son escasos los ensayos que poseen para medir su actividad biológica (4).

Para que la calidad de un propóleo se considere buena debe cumplir los siguientes requisitos: 1) estar libres de contaminantes tóxicos, 2) contener bajos porcentajes de cera, cenizas, materiales insolubles, 3) tener contenidos elevados de principios activos. En el país no se realizan estos controles a los apicultores (4).

Los EEP son una opción para la desinfección de las prótesis removibles, sin embargo hay que realizar estudios que demuestren que

no que no produce daños a las diferentes estructuras de las prótesis (estructura metálica y pigmentación de las bases).

Con esta investigación se evidenció la acción fungistática de los EEP en las bases de las dentaduras, al observar a las 24 h un nuevo crecimiento de la cepa, podemos presumir que el contacto prolongado utilizando técnicas de pincelado de los EEP en las bases de las dentaduras, en pacientes con estomatitis subprotésica pudieran ocasionar el efecto contrario del que se busca como es la remisión de la lesión.

## Conclusiones

Los extractos etanólicos de propóleos (EEP) al 20%, 30% y 40% son efectivos en la inhibición de *Candida albicans* con 5min de inmersión de las prótesis para su desinfección.

Los medios de cultivo tipo caldo no se

recomiendan para el análisis de propóleos, debido a que estos productos forman turbidez, lo cual interfiere la visualización del crecimiento de *Candida albicans*.

Los EEP al 20% presentaron inhibición de *Candida albicans* a las 24 h, ya que dentro del halo de inhibición no se mostró crecimiento de la cepa.

Los EEP al 30% y 40% presentaron un efecto fungistático, ya que se observó nuevo crecimiento de *Candida albicans* a las 24 h.

El crecimiento de la cepa de *Candida albicans* luego de las 24 h fue directamente proporcional a la concentración del EEP, ya que a mayor concentración de propóleo, mayor es la cantidad de nutrientes y por ende mayor crecimiento de la cepa.

## Referencias Bibliográficas

1. Kerr W. Introdução de abelhas africanas no Brasil. Bras. Apic. 1957; 3:211-213.
2. Spivak M, Fletcher D. The «African» honey bees. Boulder: Westview Press; 1991.
3. Winston M. The biology of the honey bees. Cambridge, M.A: Harvard Univ. Press; 1987.
4. Farre R, Frasquet I, Sanchez A. El própolis y la salud. Ars Pharmaceutica. 2004; 45: 21-43.
5. Peña R. Estandarización en propóleos: antecedentes químicos y biológicos. Ciencia e Investigación Agraria. 2008; 35: 17-26.
6. Manara L, Gromatzky A, Conde M, Bretz W. Utilização da propolis em odontologia. Revista de Faculdade de Odontologia de Bauru. 1999; 7: 15-20.
7. Bankova V, Castro S, Marucci M. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. Apidologie. 2000; 31: 3 – 15.
8. Bedascarrasbure E, Maldonado L, Álvarez A, Rodríguez E. Contenido de Fenoles y Flavonoides del propóleo Argentino. Acta Farmacéutica Bonaerense. 2004; 23: 369-372.
9. Ghasem Y, Abdolghaffar O, Hasanloei M. Antibacterial and antifungal activity of Iranian própolis against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. Pakistan Journal of biological Sciences. 2007;10: 1343 – 1345.
10. Vit P, Barberan F, García-Viguera C, Ferreres F, Camargo J. Caracterización de propóleos venezolanos. Revista del Instituto Nacional de Higiene “Rafael Rangel”, 1993; 24: 38-46.
11. Mello B, Petrus J, Hubinbin M. Desempenho do processo de concentração de extratos de própolis por nanofiltração. Ciência e Tecnologia de Alimentos. 2010; 30: 166-172.
12. Premoli G, Laguado P, Díaz N, Villarreal J, González A. Uso del propóleo en odontología. Acta Odontológica Venezolana. 2010; 48. Disponible en: <http://www.actaodontologica.com/ediciones/2010/2/art22.asp>. Recuperado el: 27/10/2010.
13. Orsi R, Sforzin J, Rall V, Funari S, Barbosa L, Fernandes A. Susceptibility profile of *Salmonella* against the antibacterial activity of propolis produced in two regions of Brazil. Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases. 2005; 11: 109–16.
14. Romo E, Moreno V, Antuna S, Fortoul T, Muñoz B. Análisis microscópico de la adherencia de *Candida albicans* *in vitro* sobre resina acrílica utilizada para bases de dentaduras procesada con tres diferentes técnicas. Revista Odontológica Mexicana. 2006; 10: 167-172.
15. Pires F, Santos E, Bonan P, De Almeida O, Lopes M. Denture stomatitis and salivary *Candida* in Brazilian edentulous patients. Journal of Oral Rehabilitation. 2002; 29: 1115 – 1119.

16. Rutala W, Weber D. Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities: 2008; 10-13.
17. Ucar A, Rojas G, Ballester L. Acción de agentes químicos en la eliminación de *Candida albicans* sobre prótesis dentales. Acta Odontológica de Venezuela. 2007; 45. Disponible en: [http://www.actaodontologica.com/ediciones/2007/2/candida\\_albicans\\_prtesis\\_dentales.asp](http://www.actaodontologica.com/ediciones/2007/2/candida_albicans_prtesis_dentales.asp). Recuperado el: 14/05/2010.
18. Pavarina A, Pizzolitto A, Machado A, Vergani C, Giampaolo E. An infection control protocol: effectiveness of immersion solutions to reduce the microbial growth on dental prostheses. Journal of Oral Rehabilitation. 2003; 30: 532-536.
19. Buegers R, Rosentritt M, Schneider-Brachert W, Behr M, Handel G, Hahnel S. Efficacy of denture disinfection methods in controlling *Candida albicans* colonization *in vitro*. Acta Odontológica Scandinavica. 2008; 66: 174-180.
20. Padilla D, Ucar A, Ballester L. Estudio comparativo entre los métodos químico y microondas para la eliminación de *C. albicans* en bases blandas y duras de prótesis removibles. Revista Odontológica de Los Andes. 2008; 3: 4-12.
21. Dixon D, Breeding L, Faler T. Microwave disinfection of denture base materials colonized with *Candida albicans*. Journal of Prosthetic Dentistry. 1999; 81: 207-214.
22. Ayuso R, Torrent J, López J. Estomatitis protésica: puesta al día. Revista del Consejo de Odontólogos y Estomatólogos. 2004; 9: 657-662
23. Silici S, Koç N, Ayangil D, Çankaya S. Antifungal activities of propolis collected by different races of honeybees against yeast isolated from patients with superficial mycoses. Journal Pharmacological Sciences. 2005; 99: 39-44.
24. Herrera C, Alvear M, Barrientos L, Montenegro G, Salazar L. The antifungal effect of six commercial extracts of Chilean propolis on *Candida* spp. Ciencia e Investigación Agraria. 2010; 37: 75-84.
25. Quintero M, Londoño A, Hernández F, Manzano P, López R, Soto C. Efecto de Extractos de propóleos mexicanos de *Apis mellifera* sobre el crecimiento de *Candida albicans*. Revista Iberoamericana de Micología. 2008 25: 22-26.
26. Ota C, Unterkircher C, Fantinato V, Shimizu M. Antifungal activity of propolis on different species of *Candida*. Mycosis. 2001; 44: 375-378.
27. Santos V, Pimenta F, Aguiar M, Do Carmo M, Naves M y Mesquita R. Oral candidiasis treatment with Brazilian ethanol propolis extract. Phytotherapy Research. 2005; 19: 652-654.
28. Wikipedia. Coeficiente Fenólico. 2010; Disponible en: [http://es.wikipedia.org/wiki/Coeficiente\\_fen%C3%B3lico](http://es.wikipedia.org/wiki/Coeficiente_fen%C3%B3lico). Recuperado el: 02/12/2011.
29. Association of official Analytical Chemist (AOAC). Disinfection, Sterilization and Preservation. 4° ed. Lea and Febiger. Philadelphia; 1991.
30. Lozina L, Boehringer S, Acosta O. Extrapolación en una forma posológica de valores obtenidos *in vitro* sobre actividad antifúngica del propóleo. Universidad Nacional del Noreste: Comunicaciones científicas y tecnológicas. 2005; 18.
31. Ota C, Muzetti P, Schimidit C, Tsunezi M. Actividade da própolis sobre bacterias isoladas da cavidade bucal. LECTA, Braganca Paulista. 1998; 16: 73-77.
32. Martins R, Pereira E, Lima S, Senna M, Mesquita R, Santos V. Effect of comercial ethanol propolis extracto n the *in vitro* growth of *Candida albicans* collected from HIV-seropositive and HIV-seronegative Brazilian patients oral candidiasis. Journal of Oral Science. 2002; 44: 41-48.
33. Salomão K, Pereira P, Campos L, Borba C. Brazilian própolis: correlation between chemical composition and microbial activity. Advance access Publication. 2008; 5: 317-324.
34. Dos Santos, Bilcalho, Radler, Neto. Comparasion of propolis from *Apis mellifera* y *Tetragonisca angustula*. Apidologie. 2003; 34: 291-298.
35. Konishi S, Frankland A, Ramalho A, Barbosa I, Tsunezi M. Análise da influência de agentes solubilizantes na atividade antimicrobiana de extratos de própolis e de uma formulação de spray hidroalcoólico. Mensagem Doce. 2004; 75: 22-25.
36. Vit P. 2004. Productos de la colmena recolectados y procesados por las abejas: Miel, polen y propóleos. Revista Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel". 2004; 35: 32-39.
37. Maidana J. Efecto de la cosecha y almacenaje sobre la calidad del propóleos. Congreso Internacional de Propóleos. Argentina. 2000.

Recibido: 24-09-2013 / Aceptado: 26-11-2014