

**EFFECTO ANTIFÚNGICO *IN VITRO* SOBRE EL CRECIMIENTO
EN *CANDIDA ALBICANS* ATCC 90028, *CANDIDA GLABRATA* ATCC
90030 Y *CANDIDA KRUSEI* ATCC 6258 EXPUESTAS AL PROPÓLEOS
DE OXAPAMPA A LAS 24, 48 Y 120 HORAS**

**THE *IN VITRO* ANTIFUNGAL EFFECT ON THE GROWTH OF
CANDIDA ALBICANS ATCC 90028, *CANDIDA GLABRATA* ATCC
90030 AND *CANDIDA KRUSEI* ATCC 6258, EXPOSED TO
PROPOLIS FROM OXAPAMPA AT 24, 48, AND 120 HOURS**

**Gina León Untiveros^a; Sonia Sacsquispe Contreras^b;
Susana Zurita Macalupú^c**

RESUMEN

Se conoce el reciente aumento de las enfermedades que comprometen el sistema inmunológico, así como el brote de candidiasis del tipo *Candida albicans* y no *albicans*, su renuencia al tratamiento y los molestos síntomas que se presentan. Se sabe también los efectos adversos de los antimicóticos para contrarrestarla. El presente estudio tiene por objetivo evaluar el efecto antifúngico del extracto etanólico del propóleo de Oxapampa *in vitro* sobre las cepas de *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida glabrata* ATCC 90030 y *Candida krusei* ATCC 6258, a las 24, 48 y 120 horas. Se utilizó el método de agar dilución en placas con controles negativo y positivo; y se realizaron lecturas a las 24, 48 y 120 horas. El extracto etanólico de Oxapampa, con una concentración mínima inhibitoria de 12 mg/ml al 5, 10, 15, 20, 25 y 30 %, presenta inhibición completa en el crecimiento *in vitro* contra las cepas de *Candida albicans* ATCC 90028, e inhibición parcial en el crecimiento de los otros tipos *Candida*, como *Candida glabrata* ATCC 90030 y *Candida krusei* ATCC 6258, observadas a las 24, 48 y 120 horas ($p < 0,05$). En este estudio podemos concluir que el extracto etanólico de propóleos (EEP) de Oxapampa presenta actividad antifúngica *in vitro* contra las cepas de *Candida albicans* ATCC 90028.

Palabras clave: *candida*, antifúngico, propóleos, recuento de colonia microbiana, pruebas de sensibilidad microbiana.

a Cirujano dentista; magíster en Estomatología – Universidad Peruana Cayetano Heredia. Facultad de Estomatología.

b Cirujano dentista; doctor en Estomatología – Universidad Peruana Cayetano Heredia.

c Especialista en Enfermedades Infecciosas y Tropicales – Instituto Nacional de Salud, Lima, Perú.

ABSTRACT

There has been a recent increase in diseases that compromise the immune system, as well as an outbreak of candidiasis (*Candida albicans* type), and non-*albicans* candida type. There is awareness of the undesirable symptoms, reluctance to treatment, and adverse effects of antifungal medication. This study aims to evaluate the antifungal effect of *in vitro* ethanol extract of propolis from Oxapampa on strains of *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida glabrata* ATCC 90030 and *Candida krusei* ATCC 6258, at 24, 48 and 120 hours. The Agar dilution method was applied on plates with positive and negative controls, while readings were taken at 24, 48, and 120 hours. The ethanol extract from Oxapampa with a minimum inhibitory concentration of 12 mg/ml at 5, 10, 15, 20, 25 and 30%, indicates a complete inhibition on the *in vitro* growth of *Candida albicans* ATCC 90028 strains; while showing a partial inhibition in the growth of other types such as *Candida glabrata* ATCC 90030 and *Candida krusei* ATCC 6258; all of them observed at 24, 48 and 120 hours ($p < 0,05$). In this study we can conclude that the ethanol extract of propolis (EEP) from Oxapampa displays *in vitro* antifungal activity on *Candida albicans* ATCC 90028 strains.

Keywords: candida, antifungal, propolis, microbial colony count, microbial sensitivity tests.

I. INTRODUCCIÓN

Las infecciones causadas por *Candida* son frecuentemente superficiales y ocurren mayormente en las mucosas. Las levaduras de *Candida* tienen gran importancia por la frecuencia con la que colonizan e infectan al organismo^{1,2}. Es así como Moreira (2006) refiere que en relación a la distribución y frecuencia de especies envueltas en candidiasis oral, la *Candida albicans* es la más prevalente en pacientes con problemas de inmunidad³. Otras especies, como *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* y *Candida krusei*, han sido relacionadas en numerosos estudios⁴⁻⁹.

El propóleo es un producto resinoso de aspecto oscuro procesado por las abejas de tipo *Apis mellifera*; proviene de yemas, brotes y peciolos de las hojas de diversas plantas y vegetales; la información respecto a la actividad biológica de este producto de Oxapampa es limitada en

nuestro país. Varios autores argumentan que este compuesto posee diversas propiedades como antifúngico, antibacteriano, antiviral, antiparasitario, antioxidante, anticancerígeno y antiinflamatorio. Su actividad biológica depende de muchos factores, incluyendo su procedencia, es decir, van variando de acuerdo a la flora en una región, la temporada, la forma de recolección, hasta de la especie de abeja que la ha colectado¹⁰⁻¹⁸.

El siguiente estudio tiene como justificación dar a conocer el posible efecto antifúngico del propóleo de Oxapampa contra las cepas American Type Culture Collection (ATCC) de *Candida albicans*, *Candida glabrata* y *Candida krusei*. Este aporte es de importancia pues, de hallar resultados positivos, podría contarse con una alternativa antimicótica natural; los resultados podrían corroborarse en estudios posteriores, respetando las etapas de investigación de un producto natural que tendría la virtud de no ocasionar efectos

secundarios con respecto a otros antimicrobicos orales.

El objetivo principal del presente estudio es evaluar el efecto antifúngico del extracto etanólico del propóleo de Oxapampa *in vitro* sobre las cepas de *Candida albicans* ATTC 90028, *Candida glabrata* ATCC 90030 y *Candida krusei* ATCC 6258 a las 24, 48 y 120 horas.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación es *in vitro*, longitudinal y observacional.

2.1. Procesamiento del extracto etanólico de propóleos

El propóleo obtenido proviene de la provincia de Oxapampa, en el departamento de Pasco, Perú, en marzo de 2010. Se realizó la identificación del producto bruto. Posteriormente, se prepararon extractos etanólicos al 5, 10, 15, 20, 25 y 30 %, por maceración durante 15 días, con etanol al 80 % a temperatura ambiente en un lugar seco y fresco y alejado de la luz; luego se filtraron con papel de filtración rápida y se obtuvieron las soluciones etanólicas del propóleo; se llevaron a congelación durante 24 horas y posteriormente se filtraron nuevamente con la misma técnica. Esto permitió extraer los componentes en forma óptima. Luego se sometieron a un rotavapor a 45 °C para extraer el etanol hasta lograr las pastas de propóleos libre del disolvente, y que se denomina extractos blandos de própolis (EBP)^{3,12,19,20}.

2.2. Cultivo de cepas

Se reactivaron cepas de referencia proporcionadas por el Laboratorio de Micología del Instituto Nacional de Salud (INS) de *Candida albicans* ATTC 90028, *Candida glabrata* ATCC 90030 y *Candida krusei* ATCC 6258. Se activaron mezclándolas con agua destilada y se mantuvieron bajo 4 °C. Luego, fueron aisladas e identificadas por pruebas biológicas (clamidosporas, presencia de halo, tubo germinativo, úrea y sembrado en agar Mycosel) y pruebas semiautomáticas (ApiC y Chrom Agar); se sembraron en agar Sabouraud Dextrosa y se observó el crecimiento de 24 a 48 horas^{6,10,12,15,21}.

2.3. Estudio *in vitro*

Se llevó a cabo de acuerdo con el método de Agar Dilución en Placas^{22,23}: el medio agar glucosado de Sabouraud, a una temperatura de 40 °C; se le adicionaron extractos etanólicos de propóleos al 5, 10, 15, 20, 25 y 30 % a una concentración de 12 mg/ml. Posteriormente, las mezclas se homogenizaron y vertieron en placas de Petri estériles, las cuales previamente fueron codificadas, e identificadas. La proporción para cada placa de Petri era de 1 ml para el extracto etanólico de propóleos y 24 ml para el Agar Sabouraud Dextrosa. Se utilizaron dos grupos controles. Para el control positivo se adicionó 1 ml de Nistatina para 24 ml de ASD. Para el control negativo, 25 ml de ASD. Como blanco, se utilizó 1 ml de etanol al 80 % más 24 ml de ASD. Ya realizadas las mezclas, se esperó en temperatura ambiente hasta que los agares solidificaran. Después de esto, a todas las placas de Petri fueron sembradas con cepas de

Candida albicans ATTC 90028, *Candida glabrata* ATCC 90030 y *Candida krusei* ATCC 6258 a una suspensión al 0,5 escala Mc Farland de 24 horas de crecimiento mediante la técnica del hisopado. Finalmente, todas las placas de Petri fueron incubadas a 35 °C. Se realizaron controles de lectura a las 24, 48 y 120 horas. En cada control se contabilizaba el crecimiento o no de las unidades formadoras de colonias (UFC), lo cual nos indica el efecto antifúngico de cada concentración de extracto. Este procedimiento fue realizado por sextuplicado con cada tipo de cepa y con cada solución enfrentada. La concentración mínima inhibitoria se determinó como la concentración mínima de EEP que mostró inhibición en crecimiento visible después del tiempo de enfrentamiento^{3,19, 24}.

Todos los datos obtenidos fueron almacenados en Excel y se trasladaron a la base de datos del programa estadístico SPSS versión 17, donde se realizaron los siguientes análisis estadísticos. El análisis univariado se realizó en las variables del estudio para establecer la frecuencia relativa y absoluta de efecto antifúngico según sustancia asignada y el tiempo de enfrentamiento. Para la variable efecto antifúngico cuantitativas se hizo las medidas de tendencia central (media). Las medidas de dispersión (desviación estándar y varianza) y valores mínimo y máximo. En el análisis bivariado y multivariado se trabajaron las variables SAE y efecto antifúngico según tiempo de enfrentamiento; se utilizó la prueba t de Student para muestras relacionadas y para aquellas soluciones asignadas para el enfrentamiento que no tuvieron distribución normal, la prueba de Wilcoxon. Para evaluar el efecto antifúngico de más de dos categorías en la variable sustancias asignadas, se utilizó Anova, para muestras

relacionadas, y Friedman, según la naturaleza de los datos. El nivel de significancia estadística fue de 95 % ($p < 0,05$).

El presente estudio, por su naturaleza, estuvo exento del proceso de análisis por comité de ética alguno.

III. RESULTADOS

Todas las soluciones de estudio presentaron mejor comportamiento en cada periodo de observación frente a la *Candida albicans* ATCC 90028 (5, 10, 15, 20, 25, y 30 %) con un CMI de 12 mg/ml. La solución de extracto etanólico al 5 % presentó mejor comportamiento frente a *Candida glabrata* ATCC 90030, presentando disminución estadísticamente significativa del crecimiento de esta cepa ($p < 0,05$) respecto a las demás soluciones y al control negativo. La solución de estudio del extracto etanólico al 25 % presentó mejor comportamiento frente a *Candida krusei* ATCC 6258, y evidenció una disminución estadísticamente significativa del crecimiento de esta cepa ($p < 0,05$) respecto a las demás soluciones y al control negativo.

IV. DISCUSIÓN

Las cepas de *Candida albicans* ATCC 90028 no presentaron crecimiento de unidades formadores de colonias en el recuento cuando se enfrentaron a los extractos etanólicos del propóleo de Oxapampa en todos los porcentajes, de 5, 10, 15, 20, 25 y 30 %, con un CMI de 12 mg/ml. Los hallazgos encontrados fueron similares a los estudios previos de sensibilidad realizados anteriormen-

te por Quinteros *et al.* en 2008³, entre otros^{2,5,14,19,20,25,26}. En atención a los resultados, se podría referir la existencia de capacidad fungicida del propóleo con un CIM de 12 mg/ml para este tipo de cepas.

En las cepas de *Candida glabrata* ATCC 90030, el extracto etanólico de propóleo al 5 % presentó menor crecimiento de unidades formadoras de colonias en el recuento con respecto al extracto etanólico de propóleo del 30 %. La actividad biológica contra el crecimiento de esta cepa se ha reportado en estudios como el de Silici *et al.* en 2005⁹, donde se encontró que este tipo de cepa era inhibida en su crecimiento por propóleo proveniente de Turquía recolectado de diferentes razas de abejas.

Para las cepas de *Candida krusei* ATCC 6258, el extracto etanólico de propóleo al 25 % presentó menor crecimiento de unidades formadoras de colonias en el recuento con respecto al extracto etanólico de propóleo del 30 %. Esta cepa ha sido estudiada por Sawaya *et al.*

2002¹⁹, donde se encontró que esta cepa presentaba inhibición en el crecimiento con extracto etanólico de propóleo con etanol al 80 % y con un CMI de 10 mg/ml. Ota *et al.* en 2001 mostró la actividad biológica que tenía esta cepa con los extractos etanólicos de propóleo de una región de Sao Paulo, Brasil²⁷.

V. CONCLUSIONES

El extracto etanólico de Oxapampa con un CMI de 12 mg/ml en todos los porcentajes trabajados presenta inhibición completa en el crecimiento *in vitro* contra las cepas de *Candida albicans* ATTC 90028.

El extracto etanólico de Oxapampa con un CMI de 12 mg/ml al 5 % y al 25 % presenta inhibición parcial de *Candida glabrata* ATCC 90030 y *Candida krusei* ATCC 6258, observadas a las 24, 48 y 120 horas.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Williams D, Lewis M. Pathogenesis and treatment of oral candidosis. *Journal of Oral Microbiology*. 2011; 3: 5771 - DOI: 10.3402/jom.v3i0.5771.
2. Ayse K, Sibel S, Filiz K. Antifungal Activity of the Honeybee Products Against *Candida spp.* and *Trichosporon spp.* *J Med Food*. 2009; 14 (1/2): 128–34.
3. Quinteros M, Londoño A, Hernández F, Manzano P, López R, Soto C, *et al.* Efecto de extractos de propóleos mexicanos de *Apis mellifera* sobre el crecimiento in vitro de *Candida albicans*. *Rev Iberoam Micol*. 2008; 25: 22-6.
4. Egusa H, Soysa N, Ellepola N, Yatani H, Samaranyake L. Oral Candidosis in HIV-Infected Patients. *Current HIV Research*. 2008; 6: 485-99.
5. Ellepola A, Samaranyake L. Oral Candidal Infections and Antimycotics. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*. 2000; 11(2): 172-98.
6. Fernandes A, Sugizaki M, Fogo M, Funari S, Lopes C. In Vitro Activity of Propolis against Bacterial and Yeast Pathogens Isolated from Human Infections. *Journal of Venomous Animals and Toxins*. 1995; 1(2).
7. Moreira M, Mikami Y, Miyaji M, Gabas R, Moretti M. Determinação da frequência de *Candida spp* na cavidade oral de pacientes graves internados no Hospital de Clínicas - Unicamp, através de testes fenotípicos. *Rev Panam Infectol*. 2006; 8(4): 16-20.
8. Santos V, Gomes R, de Mesquita R, de Moura M, Franca E, de Aguiar E, *et al.* Efficacy of Brazilian propolis gel for the management of denture stomatitis: a pilot study. *Phytother Res*. 2008 Nov; 22(11):1544-7. PubMed PMID: 18696746.
9. Silici S, Ayangil D, Çankaya S. Antifungal Activities of Propolis Collected by Different Races of Honeybees against Yeast isolated from patients with superficial mycoses. *J Pharmacol Sci*. 2005; 99: 39-44.
10. Ugur A, Arslan T. An In Vitro Study on Antimicrobial Activity of Propolis from Mugla Province of Turkey. *J Med Food*. 2004: 90–4.
11. Banskota A, Tezuka Y, Kadota S. Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytother Res*. 2001 Nov;15(7):561-71. PubMed PMID: 11746834.
12. Herrera C, Alvear M, Barrientos L, Montenegro G, Salazar L. The antifungal effect of six commercial extracts of Chilean propolis on *Candida spp.* *Cien Inv Agr*. 2010; 37(1): 75-84.
13. Arjun H, Banskota Y, Kadota K, Kadota S. Recent Progress in Pharmacological Research of Propolis. *Phytother Res*. 2001; 15: 561–71.
14. Londoño O, Penieres G, García C, Carrillo L, Quintero M, García E, *et al.* Estudio de la actividad antifúngica de un extracto de propóleo de la abeja *Apis mellifera* proveniente del estado de México. *Tecnología en marcha*. 2008; 21(1): 49-55.
15. Salomao K, Dantas A, Borba C, Campos L, Machado D, Aquino F, *et al.* Chemical composition and microbicidal activity of extracts from Brazilian and Bulgarian propolis. *Letters in Applied Microbiology*. 2004; 38(2): 87-92.

16. Santos F, Bastos E, Maia A, Uzeda M, Carvalho M, Farias L, *et al.* Brazilian propolis: physicochemical properties, plant origin and antibacterial activity on periodontopathogens. *Phytother Res.* 2003 Mar;17(3):285-9. PubMed PMID: 12672164.
17. Sforcin J, Fernandes A, Lopes C, Funari S, Bankova V. Seasonal effect of brazilian propolis on *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. *Journal of Venomous Animals and Toxins.* 2001; 7(1).
18. Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernandez-Lopez J, Perez-Alvarez JA. Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. *Journal of food science.* 2008 Nov; 73(9): R117-24. PubMed PMID: 19021816.
19. Sawaya A, Palma A, Caetano M. 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.
20. Kun Y, Masaharu I. Preparation of Water and Ethanolic Extract of Propolis and Evaluation of the Preparations. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1998; 62(11): 2230-32.
21. Lozina L, Boehringer M, D'aquino F, Acosta O. Eficacia del Propóleos sobre *Malassezia pachydermatis* Correlación de distintas Técnicas in Vitro. *Acta Farm Bonaerense.* 2006; 25(4): 560-3.
22. Quintero M LA, Hernández F, Manzano P, López R, Soto C, Carrillo L, *et al.* Efecto de extractos de propóleos mexicanos de *Apis mellifera* sobre el crecimiento in vitro de *Candida albicans*. *Rev Iberoam Micol* 2008; 25: 22-6.
23. Sawaya A PA, Caetano F, Marcucci M, da Silva I, Araujo C *et al.* Comparative study of in vitro methods used to analyse the activity of propolis extracts with different compositions against species of *Candida*. *Lett Appl Microbiol.* 2002; 35: 203-7.
24. Ostrosky E, Mizumoto M, Lima M, Kaneko T, Nishikawa S, Freitas B. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Rev Bras Farmacogn.* 2008; 18(2): 301-07.
25. Arian S, Ostrosky-Zeichner L, Lozano-Chiu M, Paetznick V, Gordon D, Wallace T, *et al.* In Vitro Activity of Nystatin Compared with Those of Liposomal Nystatin, Amphotericin B, and Fluconazole against Clinical *Candida* Isolates. *Journal of Clinical Microbiology.* 2002; 40(4): 1406-12.
26. Gomes R, Teixeira K, Cortés M, Santos M. Antimicrobial activity of a propolis adhesive formulation on different oral pathogens. *Braz J Oral Sci.* 2007; 6(22): 1387-91.
27. Ota C, Fantinato V, Shimizu MM. Antifungal activity of propolis on different species of *Candida*. *Mycoses.* 2001; 44: 375 - 78.