

Extractos etanólicos de propóleos contra *Candida albicans*: actividad antifúngica, biofilm y adhesión en materiales protésicos.

Autores: Huber LB¹, López Vallejos MJ², Galiana MB³.

1- JTP. Unidad Curricular: Clínica Integral Adulto. Coordinadora del Laboratorio de Investigación y desarrollo. Área Fitodontología

2-. JTP. Unidad Curricular: Cirugía Dentomaxilar. Integrante del Laboratorio de Investigación y desarrollo. Área Fitodontología

3- Dra en Odontología. Jefe de trabajos prácticos. Endodoncia. FOUNNE. Integrante del Laboratorio de Investigación y desarrollo. Área Fitodontología

Autor de correspondencia. Laura Huber, Dirección postal: Argentina, Corrientes, Av. Libertad 5450. CP: 3400. Teléfono: +54 0379 4457992. +54 3794655741. Email: lbhuber@odn.unne.edu.ar

Lugar: Facultad de Odontología de la U.N.N.E

RESUMEN

El propóleos, un fitofármaco de origen mixto, vegetal y animal, que es utilizado ampliamente debido a su compleja composición química, existiendo particularidades fitodemográficas que la diferencian en sus principios activos. La posibilidad del uso de propóleos en odontología ha alcanzado un alto desarrollo en la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas aprovechando al máximo sus propiedades. Entre éstas se pueden destacar las actividades bacteriostáticas, bactericida, fungistática, fungicida, virustática, viricida, antioxidante, antitumoral, cicatrizante, entre otras. Por esta razón, el objetivo de este trabajo fue determinar la actividad antifúngica de los extractos etanólicos de propóleos (EEP) sobre *Cándida albicans*, evaluar la capacidad formadora de biofilms y su adherencia a las resinas acrílicas. Se utilizó EEP al 80% para prueba de difusión en agar con discos y pocillos con el fin de determinar la sensibilidad y por medio de los

métodos de la policubeta, del tubo y agar rojo congo para observar la capacidad de formación de biofilms y la adherencia a la superficie de resinas acrílicas. La actividad inhibitoria se demostró con halos $>$ a 10mm, se observó la capacidad de las cepas en producir biofilms y su adhesión con los métodos mencionados. A partir de este trabajo podemos concluir que el EEP obtenido tiene actividad antifúngica in vitro sobre *Candida albicans* spp aislada de pacientes con candidiasis oral, observándose que estas levaduras son formadoras de biofilms microbiano con la capacidad de adherirse a diferentes superficies.

PALABRAS CLAVE: *Cándida Albicans* – Propóleos – Actividad antifúngica – Biofilms

INTRODUCCIÓN

El género *Candida* comprende más de 150 especies cuya principal característica es la ausencia de reproducción sexual (1), con un modo de desarrollo predominantemente unicelular. Solo una docena de estas especies poseen la capacidad de adaptarse a 37 °C y actuar como patógenos oportunistas en humanos, entre ellas *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. guilliermondii* y *C. parapsilosis* (2,3). Estas levaduras presentan un marcado dimorfismo celular y, en el tejido infectado, coexisten tanto formas levaduriformes como filamentosas, lo cual constituye un rasgo clave de su virulencia (4,5).

C. albicans se caracteriza además por su capacidad de formar biofilms (6), los cuales presentan una arquitectura tridimensional compleja y altamente organizada. La formación de biofilms representa un importante factor de patogenicidad, ya que confiere tolerancia a diversas terapias antifúngicas mediante la limitación de la penetración de fármacos a través de la matriz extracelular (7). Adicionalmente, el crecimiento en forma de biofilm protege a las células fúngicas de la respuesta inmune del hospedador y promueve la diferenciación fenotípica asociada a la tolerancia antifúngica (8).

En la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas, numerosos investigadores han

evaluado la actividad antifúngica de productos naturales sobre *Candida* spp., destacándose entre ellos el propóleo. Este fitofármaco de origen mixto, vegetal y animal, es una resina compleja cuya composición química varía según factores geográficos y botánicos, determinando diferencias significativas en sus principios activos (9–11). En Odontología, el uso del propóleo ha cobrado creciente interés debido a sus propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias y antifúngicas. Se ha demostrado que flavonoides como la pinocembrina y la galangina, así como el éster fenético del ácido cafeico (CAPE), poseen actividad antifúngica mediante mecanismos asociados a la inhibición de la ARN-polimerasa y alteraciones en membranas y paredes celulares (12,13).

Diversos estudios *in vitro* recientes han confirmado la eficacia antifúngica del propóleo frente a *Candida albicans*, incluyendo su actividad inhibitoria del crecimiento, la formación de biofilms y la adhesión a superficies protésicas y acrílicas, lo que refuerza su potencial aplicación clínica en el manejo de la candidiasis oral (14–16-17).

El objetivo del este trabajo fue determinar la actividad antifúngica de los extractos etanólicos de propóleo (EEP) sobre *Candida albicans* ssp, evaluar la capacidad formadora de biofilms de esta cepa y su adherencia a diferentes superficies.

DESARROLLO

Los extractos se obtuvieron por maceración simple utilizando etanol 80% como solvente de extracción y un 20% de materia bruta prima de propóleo procedente de Mendoza, Argentina, que fueron rotoevaporados para los ensayos de susceptibilidad. Para el aislamiento microbiano se tomaron muestras con hisopo estéril de la mucosa palatina de pacientes con Estomatitis Subplaca y fueron trasladadas en medios de transporte (Culturette, Eurotubo®), la identificación se realizó mediante las características fenotípicas, como la descripción de la macro y micromorfología, la tipificación auxanográfica y el medio diferencial CHROM agar *Candida*. Las cepas identificadas se conservaron a -80° C utilizando medio nutritivo adicionado con 30% de glicerol. Una vez identificada se estandarizó el Inóculo de *Candida albicans*, en suspensión de

levaduras en fase logarítmica, a la turbidez correspondiente al tubo 1 del nefelómetro de Mac Farland para los ensayos de sensibilidad in vitro mediante pruebas de difusión en agar con pocillos y discos impregnados.

En una caja de Petri con 20 mL de agar Sabouraud se realizaron perforaciones con un sacabocados de 5 mm de diámetro y se realizó la siembra en superficie con hisopo estéril, en cada una se colocaron 10 µL del extracto de al 20%, además, previamente fueron impregnados discos de papel Whatman N° 4 de 5 mm de diámetro, con 10 µl del extracto, se dejaron secar en estufa a 37° C durante 24 horas y fueron colocados en la placa. Para descartar el efecto del solvente se realizó un blanco con alcohol de 80°. Las placas se incubaron en estufa a 35-37 °C durante 48 horas en condiciones aeróbicas.

Para evaluar la capacidad de las cepas aisladas de producir biofilms se utilizaron:

1.Método de la policubeta: donde la cepa fue inoculada en 10 mL de caldo Sabouraud adicionado con 1% de glucosa e incubado a 37 °C durante 24 horas, luego en el próximo tubo se diluyó (1:100) en 10 mL de medio y por último se agregó a 2 tubos con estas disoluciones 500 µl de extracto etanólico de propóleos (EEP). Alícuotas de estas suspensiones se inocularon en pocillos de policubetas de poliestireno que fueron incubados a 37 °C durante 24 horas. Para el revelado, los pocillos se lavaron suavemente cuatro veces con solución fisiológica estéril, se fijó con una solución de acetato de sodio al 2% y se dejó secar en posición invertida durante 1 hora. Las células adheridas se colorearon con una solución de cristal violeta al 0,2% durante 5 minutos, el exceso de colorante se eliminó por dos lavados con solución fisiológica estéril. Los resultados se expresaron como: 0- no formador, 1- formador de biofilms. Se empleó un control negativo de medio sin inocular.

2- Método del tubo: una ansada de cultivo se inoculó en tubos de 10 mL caldo Sabouraud adicionado con 1% de glucosa e incubado a 37 °C durante 24 horas. Luego del período de incubación los tubos fueron lavados suavemente cuatro veces con solución fisiológica estéril, secada en posición invertida durante 1 hora y teñida con una solución de cristal violeta al 0,2%, el exceso de colorante se eliminó por dos lavados con solución

fisiológica estéril. Los resultados se expresaron como: 0- no formador, 1- formador de biofilms. Se emplearon un control de medio sin inocular.

3- Método del Rojo Congo: placas conteniendo medio Agar Rojo Congo, 10 g/l de agar y 8 g/l de rojo congo, fueron inoculadas con *C. albicans* e incubadas a 37°C durante 24 horas. La aparición de colonias negras con una consistencia cristalina y seca indicó la capacidad de la cepa de producir biofilms.

Para determinar la capacidad de las cepas de adherirse a diferentes superficies inertes se aplicó el método del tubo modificado, con la adición de placas de acrílico al caldo de cultivo Sabouraud. Para el revelado del biofilms se colocaron las placas en tubos estériles y se continuó repitiendo el mismo procedimiento citado anteriormente.

Los resultados de los halos de inhibición obtenidos por la técnica de difusión en agar por discos impregnados y pocillos se presentan en tablas y figuras, presentando media y desvío estándar. La comparación de las medias de discos y pocillos se realizó por medio de la T de Student para un $p < 0.05$ utilizando programa Infostat 2006.

RESULTADOS

Todas las muestras obtenidas de la cavidad bucal de la zona palatina de los pacientes fueron identificadas como *Cándida albicans* según técnica descrita, Fig. 1.

Mediante la prueba de difusión en agar con pocillos y discos impregnados, se determinó la actividad inhibitoria del EEP frente a la cepa *Cándida albicans*, Fig 2. Se tomó como parámetro un halo de inhibición $> 10\text{mm}$ como susceptible y $< 10\text{ mm}$ como no susceptible. Se pudo observar que en ambas técnicas el halo de inhibición del EEP sobre el crecimiento de *C. albicans* fue $> 10\text{mm}$, reportando la susceptibilidad del microorganismo frente al producto natural. Así mismo el halo de inhibición obtenido a partir de la técnica de pocillo fue superior al de los discos impregnados. En la Tabla 1 se muestran las mediciones de las pruebas realizadas en las dos técnicas y su media y desvío. En la Tabla 2 la comparación de medias de las 2 técnicas.

En la Fig. 3 se observa la evaluación de capacidad de formación de biofilms por el método de la policubeta. En la técnica del tubo, Fig. 4, se observó formación de biofilms en los tubos sembrados con la cepa en estudio. Los resultados obtenidos para evidenciar la presencia de colonias negras coincidentes con cepas formadoras de biofilms fueron positivos para esta cepa, se pudo confirmar la capacidad de las colonias aisladas en el presente trabajo. En cuanto a la formación de biofilms en las placas acrílicas el revelado demostró la capacidad de la cepa para adherirse a la superficie de la resina acrílica, Fig. 5

Figura 1: Resultados de la identificación de especie de *Candida albicans* por método de Chrom agar. A: vista superior de la placa y B: vista inferior de la placa.

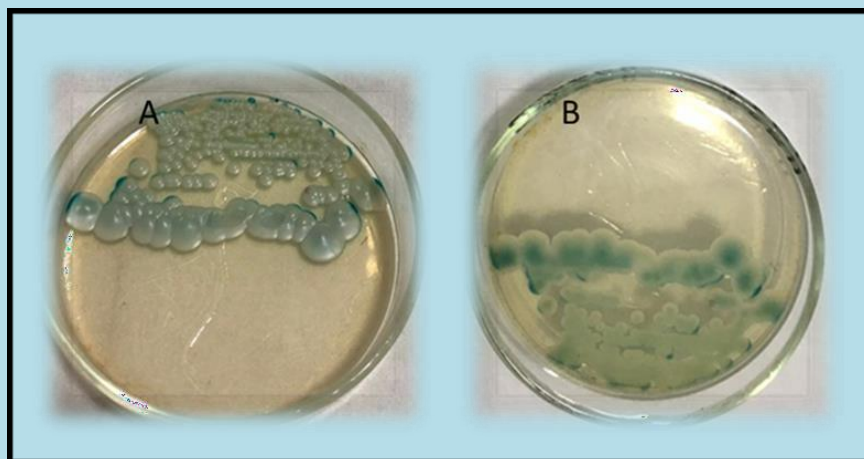


Figura 2: Prueba de difusión en agar por método de pocillos y discos impregnados. A: observación de los resultados de la inhibición, B: marcación de los límites de los halos de discos y pocillos, C, D, E y F: medición con regla milimetrada en los dos sentidos.

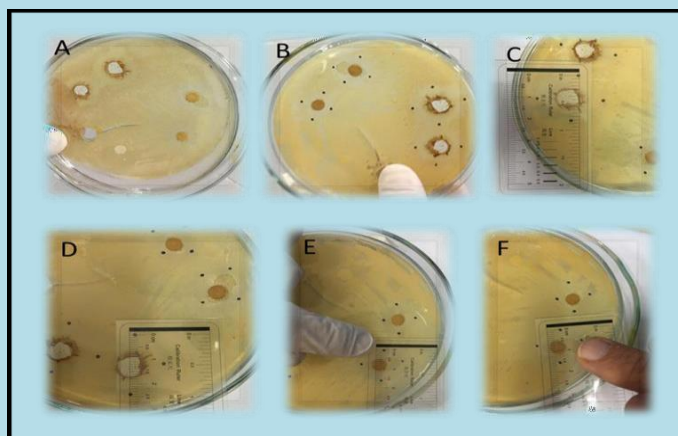


Figura 3: Método de policubeta A) Suspensiones inoculadas en la policubeta. 1: medio fresco sin inocular, 2: suspensión de *C. albicans* spp en medio, 3: suspensión 1/100 de *C. albicans* sp en medio, 4: suspensión de *C. albicans* spp más EEP y 5: suspensión 1/100 de *C. albicans* spp más EEP. a, b, c: por triplicado. B) Resultado de la policubeta. 1: a, b y c no formador de biofilms, 2 y 3: a, b y c formador de biofilms y 4 y 5: a, b y c cubeta con tinción positiva.



Figura 4: Resultado de la tinción de los tubos de vidrio para evaluar la formación de biofilms. A: tubo de vidrio inoculado con 1/100 de *C. albicans*, B: tubo de vidrio inoculado con *C. albicans* y C: tubo de vidrio inoculado con

C albicans más EEP.

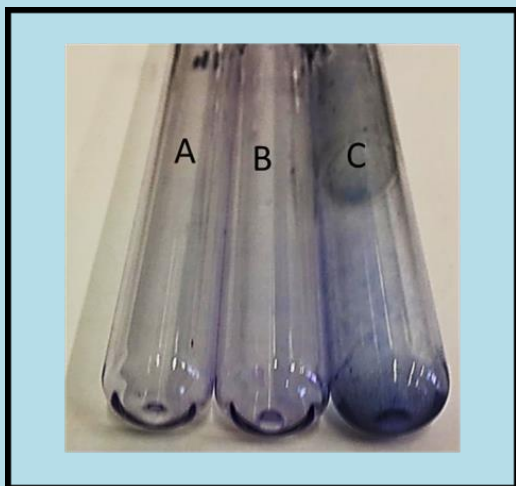


Figura 5: Técnica de adherencia a las resinas acrílicas. A: tubos estériles con medio incubado con C albicans, B: placa de acrílico transparente incubado por 24 horas, C: lavado con solución fisiológica de las placas de acrílico, D: placas de acrílicos fijadas con acetato de sodio al 0,2%, E: secado de las placas, F: preparación del colorante y G: tinción con cristal violeta.

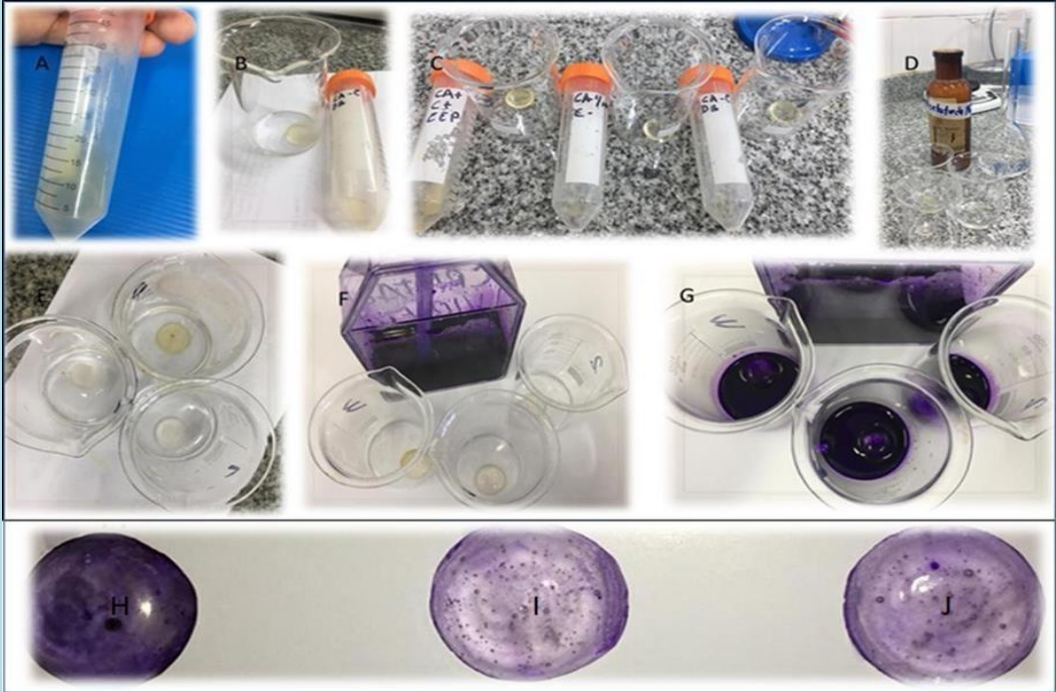


Tabla 1: Medición de halos de inhibición para el EEP frente a *Candida albicans*. Promedio total de difusión con técnica de pocillo= 21.9. Promedio total difusión con discos de papel = 14m

Ensayo	Diám. Der -izq	Diám. sup – Inf.	Promedio
Difusión con pocillos 1	22,5 mm	20.5mm	21.5mm
Difusión con pocillo 2	21mm	24mm	22.5mm
Difusión con pocillo 3	23mm	22mm	22.5mm
Difusión con pocillo 4	19.5mm	23mm	21.2mm
Difusión con papel 1	16mm	13.5mm	14.7mm

Difusión con papel 2	16mm	17.5mm	16.7mm
Difusión con papel 3	12mm	11.5mm	11.7mm
Difusión con papel 4	12.5mm	13.5mm	13mm

Tabla 2: Prueba T para comparar medias de las pruebas de pocillos y discos.

Variable	n	Media	D.E	LI (95)	LS (95)	T	P(bilateral)
Promedio pocillos	4	21.93	0.68	20.85	23.00	66.95	<0,0001
Promedio discos	4	14.03	2.17	10.58	17.47	12.95	0,0010

DISCUSION

En el presente estudio se demostró la actividad inhibitoria in vitro del extracto etanólico de propóleos (EEP) frente a *Cándida albicans*, con halos de inhibición de 21,9 mm en la técnica de pocillos y 14 mm en discos impregnados. La mayor difusión observada en pocillos coincide con reportes recientes que indican que en los discos parte de los compuestos fenólicos puede quedar retenida en la matriz del papel, reduciendo su disponibilidad antifúngica (18). Resultados similares fueron publicados por PrataViera et al. (2022), quienes observaron mayor efecto antifúngico del EEP frente a *C. albicans* cuando el extracto se aplicó en pocillos en comparación con discos debido a la liberación más eficiente de flavonoides y CAPE (19).

Estudios contemporáneos confirman la efectividad del propóleo como agente antifúngico. Rodríguez-Canales et al. (2023) demostraron halos superiores a 15 mm frente a *C. albicans* con extractos etanólicos latinoamericanos, mientras que Mohammadi (2021) registró efectos fungistáticos y fungicidas dependientes de la concentración y del origen geográfico del propóleo (20,21). De manera similar, De Farias et al. (2020) reportaron que el EEP inhibe la formación de hifas y genera desorganización celular, atribuyendo esta acción a los flavonoides pinocembrina, galangina y CAPE (22).

Otras investigaciones recientes compararon la acción del propóleo con antifúngicos convencionales. Castillo-Hernández et al. (2022) informaron que combinaciones de EEP con fluconazol potencian el efecto antifúngico frente a cepas resistentes, mientras que Ribeiro et al. (2021) demostraron que el propóleo muestra una CIM comparable a la de nistatina en cepas clínicas de *C. albicans* (23,24). Estos datos respaldan los resultados obtenidos en este estudio y confirman que el propóleo representa una alternativa terapéutica viable para el manejo de la candidiasis oral, especialmente ante el aumento de la resistencia antifúngica documentada desde 2020 (Arastehfar, et.,al 2020).

Respecto a la capacidad formadora de biofilms, en este estudio se corroboró la producción de biofilms en 24 horas mediante las técnicas de tubo, policubeta y agar rojo Congo. Este hallazgo coincide con investigaciones recientes que describen la rápida maduración de biofilms de *C. albicans*, los cuales adquieren estructura tridimensional en menos de un día, aumentando su resistencia a agentes antimicrobianos. Rossoni et al. (2021) destacaron que la formación de biofilms constituye el principal mecanismo de virulencia de *C. albicans* y explicaron que su matriz extracelular reduce la penetración de antifúngicos y protege al microorganismo frente a la respuesta inmune.

En relación con la adhesión a superficies acrílicas, los resultados observados también coinciden con literatura reciente. Un estudio de Wang et al. (2020) demostró que la rugosidad superficial del acrílico favorece la adhesión de *C. albicans* y potencia la formación de biofilms, lo que explica la colonización observada en las placas de resina utilizadas en este trabajo (28). Además, Pineda et al. (2021) confirmaron que *C. albicans*

muestra mayor afinidad por acrílicos de polimetilmetacrilato (PMMA) y por poliamidas, debido a sus características hidrofóbicas y microtopográficas (29).

Por su parte, Cavalheiro y Teixeira (2021) indicaron que la colonización de *Candida* puede presentarse tanto en biofilms monoespecíficos como mixtos, coexistiendo con bacterias orales en condiciones de desbalance microbiológico, lo que incrementa la resistencia y persistencia clínica de las lesiones (30). Esto respalda la importancia de evaluar la interacción de *C. albicans* con biomateriales odontológicos como parte del análisis de su patogenicidad.

Ante la diversidad de métodos disponibles para evaluar la formación de biofilms y la adhesión fúngica, los procedimientos empleados en este estudio —incluyendo tinciones con cristal violeta y rojo Congo— han sido validados recientemente por investigaciones *in vitro* como técnicas confiables y reproducibles para la cuantificación de biomasa fúngica adherida (31). En conjunto, los resultados obtenidos son consistentes con la literatura actual y fortalecen la evidencia sobre el potencial del propóleo como agente antifúngico y anti- biofilm en el ámbito odontológico.

CONCLUSIÓN:

A partir de los resultados obtenidos, se puede concluir que el extracto etanólico de propóleo (EEP) procedente de Mendoza presenta actividad antifúngica *in vitro* significativa frente a *Candida albicans* aislada de pacientes con candidiasis oral, evidenciada por halos de inhibición superiores a 10 mm en ambas metodologías empleadas. El método de pocillos mostró una difusión más eficiente del extracto en comparación con los discos impregnados. Asimismo, se verificó que *Candida albicans* posee elevada capacidad formadora de biofilms, confirmada mediante los métodos de policubeta, tubo y agar rojo Congo. La cepa también mostró fuerte adherencia a superficies acrílicas, lo que refuerza la relevancia clínica de su interacción con materiales odontológicos utilizados en prótesis.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA

1. Wongsuk T, Pumeesat P, Luplertlop N. Candida albicans morphogenesis is controlled by various signaling pathways. J Mycol Med. 2020;30(1):100915. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2020.100915>
2. Noble SM, Gianetti BA, Witchley JN. Candida albicans cell-type switching and functional plasticity in host interactions. Nat Rev Microbiol. 2020;18(6):349–359. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0312-5>
3. Cavaleiro M, Teixeira MC. Candida Biofilms: Threats, Challenges, and Promising Strategies. Front Med. 2021;8:620284. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.620284>
4. Lamaris GA, Chamilos G. Understanding Candida albicans invasiveness: new insights. Med Mycol. 2021;59(3):235–243. <https://doi.org/10.1093/mmy/myaa070>
5. Rossoni RD, Barbosa JO, Vilela SF, Jorge AO, Junqueira JC. Candida albicans biofilms and their clinical impact. J Fungi. 2021;7(5):346. <https://doi.org/10.3390/jof7050346>
6. Lohse MB, Gulati M, Johnson AD, Nobile CJ. Development and regulation of Candida albicans biofilms. Curr Opin Microbiol. 2020;52:1–6. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.04.001>
7. Ribeiro M, Simões LC, Simões M. Antifungal effect of propolis on Candida albicans biofilms. Arch Oral Biol. 2021;122:104979. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2020.104979>
8. Piccinelli AL, Mencherini T, Celano R, Mouhoubi-Tafinine Z, Dugay A, et al. Chemical and functional profiling of propolis. Molecules. 2022;27(3):613. <https://doi.org/10.3390/molecules27030613>
9. Bankova V, Popova M, Trusheva B. New trends in propolis research. Apidologie. 2021;52:63–79. <https://doi.org/10.1007/s13592-020-00774-9>
10. Tran TD, Ton ND, Ly BV, Le KM, et al. Polyphenol-rich propolis: Antimicrobial mechanisms and clinical potential. J Appl Microbiol. 2023;134(5):lxad067. <https://doi.org/10.1093/jambio/lxad067>
11. Rodríguez-Canales M, et al. In vitro antifungal activity of ethanolic propolis extract against Candida albicans. BMC Microbiol. 2023;23:112. <https://doi.org/10.1186/s12866-023-02830-3>
12. Mohammadi F, Javidi E, et al. Antifungal effects of propolis on Candida species: A systematic review. J Med Life. 2021;14(3):350–358. <https://doi.org/10.25122/jml->

- 2020-0132
13. Pratavia L, et al. Comparative antifungal activity of red propolis and nystatin against *Candida* species. *J Apic Res.* 2022;61(4):413–420.
<https://doi.org/10.1080/00218839.2021.2022760>
 14. De Farias N, et al. Antifungal activity of Brazilian propolis on *Candida albicans* biofilms. *Herb Med.* 2020;23:100376.
<https://doi.org/10.1016/j.hermed.2020.100376>
 15. Castillo-Hernández R, et al. Potentiation of fluconazole by propolis extract against resistant *Candida albicans*. *Odovtos.* 2022;24(1):45–54.
<https://doi.org/10.15517/odovtos.v24i1.49076>
 16. Ribeiro R, et al. In vitro comparison of propolis and nystatin against *Candida albicans*. *Arch Oral Biol.* 2021;126:105118.
<https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2021.105118>
 17. Arastehfar A, Gabaldón T, et al. *Candida albicans* resistance patterns in the post-2020 era. *Microbiol Spectr.* 2021;9(2):e0031521. <https://doi.org/10.1128/Spectrum.00315-21>
 18. Costa MI, et al. Methodological variables in diffusion assays with natural antifungals. *J Fungi.* 2021;7(7):553. <https://doi.org/10.3390/jof7070553>
 19. Pratavia L, et al. Enhanced diffusion of propolis in agar well diffusion compared to disks. *J Apic Res.* 2022;61(4):421.
 20. Frontini M, et al. Effects of propolis polyphenols on *Candida albicans* morphology. *Med Mycol.* 2022;60(2):myac008.
 21. Wang Y, Xu J, et al. Surface roughness of acrylic resins influences *Candida albicans* adhesion. *J Prosthodont.* 2020;29(5):445–451. <https://doi.org/10.1111/jopr.13174>
 22. Pineda S, Mosquera J. Adhesion of *Candida albicans* to PMMA and polyamide resins. *Biosalud.* 2021;20(1):55–65.
 23. Teixeira MC, et al. Mixed-species biofilms in oral candidiasis: interactions and resistance. *J Oral Microbiol.* 2022;14(1):2073145.
<https://doi.org/10.1080/20002297.2022.2073145>
 24. de Faria AF, et al. Crystal violet and Congo red as reliable quantification methods for fungal biofilms. *J Microbiol Methods.* 2021; 185:106229.



<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2021.106229>