



FACULTAD DE MEDICINA HUMANA Y CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA PROFESIONAL DE ESTOMATOLOGIA

TESIS

EFFECTO INHIBITORIO *IN VITRO* DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE
PROPÓLEO AL 80% Y GLUCONATO DE CLORHEXIDINA AL 0,12%
SOBRE *CANDIDA ALBICANS*

**PARA OPTAR EL TITULO PROFESIONAL DE CIRUJANO
DENTISTA**

PRESENTADO POR:

BACHILLER: FIORELA VASQUEZ MONTENEGRO

ASESOR

MAG. TAMMY MARGARITA HONORES SOLANO

TRUJILLO- NOVIEMBRE

2018

DEDICATORIA

En primer lugar, a Dios por haberme guiado por el camino del bien y la responsabilidad hasta ahora; en segundo lugar, a cada uno de los que son parte de mi familia a mi padre FELIX VASQUEZ y a mi madre CARMEN MONTENEGRO, y a mis hermanos PERCY y CYNTYA; por haberme dado siempre la fuerza y apoyo incondicional que me han ayudado y llevado hasta donde estoy ahora.

AGRADECIMIENTO

A la Dra. Tammy Margarita Honores Solano por asesorarme en la creación de este trabajo de investigación.

Al Mblgo. Adderly Roland Benites Murrieta por sus conocimientos y la asesoría teórica y técnica necesaria aportados en la parte microbiológica y bioquímica de mi trabajo.

A la Universidad Nacional de Trujillo por abrirme sus puertas para adquirir nuevos conocimientos y así formarme profesionalmente.

A cada Doctor que aportó sus conocimientos para poder lograr mis objetivos.

A mis amigos, que aportaron alegrías en momentos de tensión, y por haber compartido mis logros: María y César

RESUMEN

El objetivo del estudio fue comparar el efecto antifúngico del extracto etanólico de propóleo al 80% y del gluconato de clorhexidina al 0,12% frente a *Candida albicans*.

El estudio fue experimental *in vitro*, para ello se enfrentó a *Candida albicans* a una concentración del 80% de propóleo y a 0,12% de gluconato de Clorhexidina a 12 y 24 horas, teniendo como resultado que a las 12 y 24 el extracto etanólico de propóleo al 80%, resultó ser efectivo contra *Candida albicans*, observándose un crecimiento de 0.0 x 100 UFC/ml, en cuanto a gluconato de clorhexidina al 0,12% tuvo los mismos resultados con un 0.0 x 100, en ambos casos hubo ausencia de crecimiento. Se concluye que no hay diferencia en el efecto inhibitorio *in vitro* entre extracto etanólico de propóleo al 80% y gluconato de clorhexidina al 0,12% sobre *Candida albicans* por tener el mismo efecto fungicida tanto a los 12 como a 24 horas.

Palabras clave

Inhibición; propóleo

ABSTRACT

The objective of the study was to compare the antifungal effect of ethanol extract of 80% propolis and 0.12% chlorhexidine gluconate against *Candida albicans*. The study was experimental *in vitro*, for which *Candida albicans* was faced with a concentration of 80% propolis and 0.12% chlorhexidine gluconate at 12 and 24 hours, with the result that at 12 and 24 the ethanolic extract of Propolis at 80%, was effective against *Candida albicans*, showing a growth of 0.0 x 100 CFU / ml, as for chlorhexidine gluconate at 0.12% had the same results with 0.0 x 100, in both cases there was an absence of increase. It is concluded that there is no difference in the *in vitro* inhibitory effect between ethanol extract of 80% propolis and 0.12% chlorhexidine gluconate on *Candida albicans* for having the same fungicidal effect at both 12 and 24 hours.

Keywords

Inhibition; Propolis

INDICE

INDICE DE TABLAS	8
INDICE DE GRAFICOS	9
INTRODUCCION	10
CAPITULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	12
1.1. Descripción de la realidad problemática	12
1.2. Formulación del problema	14
1.3. Objetivos de la investigación	14
1.4. Justificación de la investigación	14
1.4.1. Importancia de la investigación	14
1.4.2. Viabilidad de la investigación	15
1.5. Limitaciones del estudio	15
CAPITULO II: MARCO TEORICO	16
2.1. Antecedentes de la investigación	16
2.2. Bases Teóricas	23
2.1.1. <i>Candida albicans</i>	23
2.1.2. Clorhexidina	28
2.3. Definición de términos básicos	30
CAPITULO III: HIPOTESIS Y VARIABLES DE LA INVESTIGACION	31

3.1. Formulación de hipótesis principal y derivada.....	31
3.1. Variables; dimensiones e indicadores y definición conceptual y operacional	31
3.1.1. Variable independiente	31
3.1.2. Variable dependiente	31
3.1.1 Operacionalización de Variables.....	32
CAPITULO IV: METODOLOGIA.....	33
4.1. Diseño metodológico	33
4.2. Diseño muestral.....	33
5.1. Análisis descriptivo, tablas de frecuencia, gráficos, dibujos, formas, etc.....	40
5.2. Discusión.....	44
CONCLUSIONES	48
RECOMENDACIONES	49
FUENTES DE INFORMACION	50
ANEXOS.....	54
Anexo 1: Carta de presentación.....	55
Anexo 2: Constancia desarrollo de la investigación	56
Anexo 4: instrumento de recolección de datos.....	57
Anexo 5: Matriz de consistencia	58
Anexo 6: Fotografías.....	59

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Recuento de *Candida albicans* en UFC/mL en caldo Sabouraud 4% glucosa para los diferentes sistemas de tratamiento incubado a 36°C durante 12 horas.....40

Tabla 2. Recuento de *Candida albicans* en UFC/ ml en caldo Sabouraud 4% glucosa para los diferentes sistemas de tratamiento incubado a 36° C durante 24 horas.....42

INDICE DE GRAFICOS

Grafico 1: Efecto inhibitorio del extracto etanólico de propóleo al 80% y de clorhexidina al 0.12% sobre el crecimiento de *C. albicans* en caldo Sabouraud 4% glucosa incubado a 36°C durante 12 horas.....41

Grafico 3. Efecto inhibitorio del extracto etanólico de propóleo al 80% y de clorhexidina al 0.12% sobre el crecimiento de *C. albicans* en caldo Sabouraud 4% glucosa incubado a 36°C durante 24 horas.....43

INTRODUCCION

El propóleo es una sustancia resinosa, gomosa y balsámica, recolectada por las abejas con la finalidad de garantizar la asepsia de la colmena, es importante resaltar que en su composición química se han aislado terpenos polisacáridos, ácidos aromáticos, polifenos, esterres de ácidos fenólicos, minerales, vitaminas aminoácidos.

Es muy bien tolerado y su uso no produce daño, es prácticamente insoluble en agua, pero soluble en alcohol, razón por la cual la mayoría de investigaciones se realizan a través de extractos etanólicos.

La mayoría de sus propiedades son bien conocidas y documentadas, sus efectos bactericidas y bacteriostáticos sobre un importante número de bacterias y hongos, además de sus efectos antiviral, antiinflamatorio, analgésico, cicatrizante, estimulando la regeneración tisular.

A lo largo del tiempo se ha ido destacando su investigación debido a la importancia de buscar sustancias naturales, que tengan menos incidencia de daño a nuestro organismo, con menos compuestos químicos como la clorhexidina por el mismo hecho de contener excipientes como el metilparabeno que se usa mucho en enjuagues bucales, irrigantes para endodoncia, para hacer frente a los microorganismos que hoy en día se siguen volviendo resistentes como es el caso de

Candida albicans un hongo saprofito oportunista produce enfermedades solamente cuando hay deterioro de los mecanismos protectores habituales. La candidiasis pseudomembranosa (muguet, monoliasis) es la infección fúngica más frecuente de la cavidad oral y especialmente frecuente en las personas que se vuelven vulnerables por diabetes mellitus, anemia, antibioterapia o tratamiento con glucocorticoides, inmunodeficiencia o enfermedades debilitantes como el cáncer diseminado.

Teniendo en cuenta lo expuesto es que el propósito de investigación fue comparar el efecto inhibitorio *in vitro* entre extracto etanólico de propóleo y gluconato de clorhexidina al 0,12% sobre *Candida albicans*.

CAPITULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1. Descripción de la realidad problemática

Uno de los lugares del cuerpo humano que más flora bacteriana presenta, es la cavidad bucal, debido a la peculiaridad de nutrientes, pH y humedad, que favorecen el crecimiento de microorganismos selectos, entre los que se encuentra *Candida albicans*, agente causal de candidiasis, la que puede variar desde lesiones superficiales en piel y mucosas, sistema gastrointestinal, piel y vagina, por lo que se le consideran agentes infecciosos endógenos específicos, y sólo producen infección en presencia de una predisposición local o general manifiesta. ¹

Los factores predisponentes para la aparición de candidiasis tienen que ver con la malnutrición, infecciones concurrentes, el tratamiento con antibióticos e inmunosupresores; en cavidad oral en el caso de prótesis mal ajustadas, el embarazo, SIDA. ²

Dentro de los antimicrobianos eficaces contra los microorganismos, tenemos, la clorhexidina, un antiséptico formulado como enjuagatorio, presentándose en varias concentraciones. La eficacia antimicrobiana de la clorhexidina permite controlar otras bacterias orales, siendo además efectivo en el control de hongos como *Candida albicans*, es estable a temperatura ambiente y necesita ser protegido de la luz, es un agente que desestabiliza y penetra las membranas de las células bacterianas.

A bajas concentraciones exhibe un efecto bacteriostático, mientras que a altas concentraciones es bactericida, su uso prolongado en boca produce un leve desplazamiento de la flora; a nivel dentario su reacción adversa más común es la pigmentación marrón de algunos materiales de restauración y de las mucosas, sobre todo el dorso de la lengua, y alteración del gusto.²

En la búsqueda de un antimicótico ideal que combata infecciones como la candidiasis oral en base a la biodiversidad de plantas medicinales que permita conseguir los objetivos en los tratamientos de la medicina oral, libre de los efectos secundarios de los medicamentos sintéticos como clorhexidina, la medicina tradicional intenta por todos los medios encontrar alternativas de solución contra *Candida albicans*, con productos naturales, económicos y prácticos, de modo que ayuden en la eliminación de este microorganismo de difícil erradicación. Dentro de estos productos encontramos el propóleo que es una resina cerosa, de composición compleja y consistencia viscosa, que las abejas recolectan de los árboles y utilizan en la reconstrucción, reparación y aislamiento y protección de su colmena.³

Una de las muchas propiedades del propóleo es su capacidad antimicrobiana, esto ha sido probado por la existencia de múltiples estudios bacteriológicos *in vivo* e *in vitro*, donde se ha podido confirmar su acción bacteriostática y bactericida, la acción antibacteriana que posee el propóleo, se les atribuye a sus constituyentes principalmente a los flavonoides, ácidos grasos, ésteres, hidroxiacidos,

sesquiterpenos y demás componentes, como la acacetina, crisina, galangina, pinocembrina, pinobanksina, naringenina y quercetina, que juntos establecen un sinergismo significativo para ejercer esta actividad biológica. ⁴

1.2. Formulación del problema

¿Cuál es la diferencia del efecto inhibitorio *in vitro* entre extracto etanólico de propóleo al 80% y gluconato de clorhexidina al 0,12% sobre *Candida albicans*?

1.3. Objetivos de la investigación

Objetivo principal

Comparar el efecto inhibitorio *in vitro* entre extracto etanólico de propóleo al 80% y gluconato de clorhexidina al 0,12% sobre *Candida albicans*.

Objetivos secundarios

Determinar el efecto inhibitorio *in vitro* de clorhexidina al 0,12% sobre *Candida albicans* en 12 y 24 horas.

Determinar el efecto inhibitorio *in vitro* de propóleo al 80% sobre *Candida albicans* en 12 y 24 horas.

1.4. Justificación de la investigación

1.4.1. Importancia de la investigación

El tema de investigación estuvo dirigido a la utilización de una sustancia antimicrobiana de origen natural como el extracto de propóleo que inhibe el crecimiento de *Candida albicans*, sugiriendo que al ser natural no generará

alteraciones futuras en la cavidad oral¹ no desestimando la existencia de sustancias antimicrobianas químicas como clorhexidina, que también es eficaz para la inhibición de este microorganismo , enfatizando que su utilización prolongada está abierta en provocar efectos secundarios en el organismo.

La importancia de este estudio está en la búsqueda de una sustancia natural como es el propóleo, que tenga un efecto antifúngico para la inhibición del crecimiento de colonias de *Candida albicans*, brindando así datos relevantes para investigaciones futuras.

El tema de investigación busca la eficacia *in vitro* del extracto de propóleo al 80%, y compararlo con la clorhexidina sobre los cultivos de *Candida albicans*, y medir cual es la más efectiva y así tener el uso de una sustancia natural que por sus propiedades biológicas representa menos riesgo a la salud de los pacientes.

1.4.2. Viabilidad de la investigación

El presente trabajo de investigación fue posible de desarrollar, debido a que se contó con el apoyo del laboratorio de la Universidad Nacional de Trujillo. Así también se contó con el recurso económico y humano necesario para su realización.

1.5. Limitaciones del estudio

La falta de un microscopio de contrastes de fases y de fluorescencia, para hacer mucho más sencillo el recuento de microorganismos.

CAPITULO II: MARCO TEORICO

2.1. Antecedentes de la investigación

Huaytalla y Col (Lima 2018) evaluaron la eficacia *in vitro* del efecto inhibidor del extracto etanólico de propóleo en comparación al gluconato de clorhexidina frente a cepas de *Lactobacillus acidophilus*, la población estuvo conformada por cepas de *Lactobacillus acidophilus* de uso comercial, con una muestra de 30 cultivos en placas petri con agar base sangre, colocándose discos de papel Whatman N° 40 embebidos con extracto etanólico de propóleo al 15% y 30%, así como gluconato de clorhexidina 0,12%, como control positivo y alcohol de 70° como control negativo. Se desarrolló el cultivo en condiciones de anaerobiosis a 37 °C. En los resultados se obtuvo que la concentración al 15% y 30% del extracto etanólico de propóleo presenta un mayor efecto inhibidor promedio de 8,15 mm y 11,75 mm a las 48 horas y de 11,40 mm y 14,25 mm a las 72 horas, respectivamente; en relación al halo de inhibición promedio producido por el gluconato de clorhexidina al 0,12% a las 48 y 72 horas, que fue de 6,55 mm y 8,00 mm. Como conclusiones se obtuvo que el extracto etanólico de propóleo al 30% es más efectivo *in vitro* que la clorhexidina al 0,12% para el control de *Lactobacillus acidophilus*.

Espinoza (Quito 2017) determinó el efecto antifúngico *in vitro* del extracto de propóleo ecuatoriano a las concentraciones del 15% y 30% comparado con la nistatina sobre la cepa de *Candida albicans* y midió cual es la más efectiva. Como resultado determinó que el extracto de propóleo ecuatoriano al 15% tuvo un efecto inhibitorio “nulo” y al 30% fue “sensible” lo que nos indica que hubo un mayor efecto inhibitorio en el extracto de propóleo ecuatoriano al 30%. Se concluyó que las colonias de *Candida albicans* demostraron ser sumamente sensible a la nistatina apreciándose un halo de inhibición de 25 mm.

Ayala (Quito 2017) evaluó la acción inhibitoria del propóleo del Cantón Baños sobre el crecimiento de *Candida albicans* en acrílico para bases de prótesis totales y a su vez se comparó cual es mejor en la acción inhibitoria del propóleo al 10% con el propóleo al 15%, el presente estudio se llevó a cabo con la elaboración de 45 discos de acrílico termocurados. Los discos fueron inmersos en un matraz, que contenía una solución con el hongo *Candida albicans* previa desinfección de los discos y se incubaron con la finalidad de promover el crecimiento de la cepa, se retiró los discos de acrílico y se colocó cada uno en un tubo de ensayo que previo contenían propóleo al 10% y 15% otros 15 discos con agua destilada como grupo control. Para comprobar la eficacia de la desinfección, se procedió a la siembra en agar sabouraud, transcurridas las 24 y 48 horas se observó ausencia en el crecimiento fúngico.

Joya y col. (Venezuela 2017) evaluaron la actividad fungistática y fungicida de extractos etanólicos de propóleos sobre el crecimiento *in vitro* de cepas del género *Candida*. El objetivo fue determinar la actividad fungistática y fungicida de propóleo venezolano y de tres regiones del mundo. Para ellos cepas del complejo *C.albicans*, *C. guillermondi*, *C. krusei* y *C.tropicalis* se enfrentaron a distintas concentraciones de extractos etanólicos de propóleos. Los propóleos de mayor actividad biológica fueron los de Alemania e Italia (10,2 mg/ml), seguidos por Venezuela (15,6 mg/ml) y España (18,8 mg/ml), en seis tubos se realizaron diluciones seriadas (de 1ml) de cada propóleo a partir de 60%,30%,15%,7,5%,3,75%,1,87% en concentraciones que oscilaban en 13,12 y 100 mg/ml. La CMI en las especies más sensibles a los propóleos fueron *C. krusei*, *C. guillermondi*, los extractos etanólicos de propóleos italiano y alemán son fungicidas en todas las cepas estudiadas. Se concluye que los extractos etanólicos de propóleos tienen efectos fungistáticos y fungicidas sobre las especies *C. albicans*, *C. krusei*, *C guillermondi* y *C. tropicalis*, la *C. tropicalis* es las especies más resistente a la acción biológica del propóleo y *C. krusei* y *C guillermondi* las más sensibles; los extractos etanólicos de propóleos de Alemania e Italia son los más efectivos contra las especies de *Candida spp.*

Maureira y col. (Chile 2017) 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*. 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.

Castro (Quito 2016) evaluó el efecto inhibitorio del extracto etanólico de propóleo al 10%, 20% y 40% sobre bloques de resina acrílica contaminados con *Candida albicans*. Como resultados obtuvo que a las 24 horas de incubación de los medios de cultivo se observó que el extracto etanólico de propóleo en sus tres concentraciones al 10%, 20% y 40% así como etanol al 96%, tienen efecto inhibitorio sobre los bloques de resinas acrílica contaminados con *Candida albicans* a partir de los 5 minutos; excepto en las del grupo control negativo. A las 48 horas se observa que no hay crecimiento de la levadura en los medios de cultivo por lo que no se modifican los resultados que se observaron a las 24 horas. En sus conclusiones mencionó que el extracto etanólico de propóleo al 10%, 20% y 40%

son efectivos en la inhibición de *Candida albicans*, con un mínimo de 5 min de inmersión de los bloques de resina acrílica contaminados con las cepas de la levadura, donde no se observó crecimiento.

Ramírez (Puno 2016) determinó el efecto inhibitorio del extracto etanólico de propóleo sobre *Streptococcus mutans* y *Candida albicans*. Teniendo como resultado que el halo inhibitorio para *Streptococcus mutans* es a partir todas las concentraciones, empezando del 25 % con un halo de inhibición de 7.5 mm, al 50% con 10.5 mm, al 75% con 11.7 mm y al 100% con 14.25 mm; mientras que para *Candida albicans* el halo de inhibición es a partir de la concentración de 50% con 6.95 mm, al 75% con 8.6 mm y al 100% con 11.8 mm. Se concluye que el propóleo etanólico a mayores concentraciones presenta mayor actividad inhibitoria para el *Streptococcus mutans* y en menor efecto inhibitorio sobre *Candida albicans*.

Gil y Col. (Venezuela 2015) determinaron el efecto fungistático y fungicida de un extracto etanólico de propóleo comercial al 70% proveniente de un apiario sobre de cuatro especies de *Candida*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii*, Complejo *C. albicans*, *C. glabrata*, la metodología utilizada fue la técnica de macrodilución en tubo. El extracto de propóleos demostró efecto fungistático total a 15% sobre *C. parapsilosis* en 24 horas de incubación y sobre complejo *Candida albicans* a 48 horas de incubación. El efecto fungistático parcial fue observado en 24 horas de incubación a una concentración de 8% para *C. guilliermondi*, *C. glabrata* y Complejo *C. albicans* y

en 48 horas de incubación a 11% para *C. guilliermondii*, 15% para *C. parapsilosis* y 19% *C. glabrata*. El efecto fungicida en 24 horas fue de 11% para *C. guilliermondii*, Complejo *C. albicans* y *C. glabrata* y de 19% para *C. parapsilosis*. El efecto fungicida en 48 horas de incubación fue de 15% para *C. guilliermondii*, 19% para *C. parapsilosis* y Complejo *C. albicans* y 23% para *C. glabrata*. Se evidencia que el tiempo de incubación más eficaz fue el de 48 horas y que la especie más sensible fue *C. guilliermondii* y la especie más resistente *C. glabrata*, el presente trabajo demostró que el extracto etanólico del propóleo tiene efecto fungistático y fungicida *in vitro* en las cepas estudiadas.

De la Cruz (Trujillo 2013). Evaluó el efecto antimicótico de cuatro concentraciones de extracto etanólico de propóleo sobre el crecimiento de *Candida albicans* y a la vez compararlo con el antimicótico sintético nistatina. Se realizó utilizando 4 concentraciones del extracto etanólico de propóleo (25%, 50%, 75% y 100%), y el medicamento nistatina (100 000 UI solución) las cuales fueron puestas en contacto con el microorganismo de estudio y mediante el método de halos de inhibición se pudo determinar el efecto en el crecimiento de este a las 24 horas. Los resultados indicaron que la actividad antimicótica del extracto etanólico de propóleo fue aumentando conforme aumentaba la concentración siendo la concentración del 100% la de mayor efecto antimicótico. Finalmente se concluyó que todas las

concentraciones de extracto etanólico de propóleo utilizadas en el presente estudio tuvieron efecto sobre el crecimiento *in vitro* de *Candida albicans*.

2.2. Bases Teóricas

2.1.1. *Candida albicans*

El género *Candida* incluye ocho especies de hongos de los cuales *Candida albicans* puede presentarse en forma de levadura (espora), levadura pseudohifas o en forma de largas hifas tabicadas ramificadas. La forma de hifas suele estar presente cuando se aíslan los microorganismos a partir de un proceso infeccioso, existen cerca de 200 especies con diversas características.^{5 6 7}

Es un habitante normal de la cavidad oral que se encuentra en el 30% al 40% de la población; produce enfermedades solamente cuando hay deterioro de los mecanismos protectores habituales. La candidiasis seudomembranosa (muguet, moniliasis) es la infección fúngica más frecuente de la cavidad oral y especialmente frecuente en las personas que se vuelven vulnerables por diabetes mellitus, anemia, antibioterapia o tratamiento con glucocorticoides, inmunodeficiencia o enfermedades debilitantes como el cáncer diseminado. Las personas con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (sida) tienen un riesgo especial.⁷

Características Biológicas

La *Candida albicans* es un microorganismo saprofito, en su composición química está compuesta por 30 a 50% de polisacáridos y 20 a 40% está representada por proteínas, carbohidratos 65 a 82%, fosforo 0,5%, y glucosamina 1,5% que influye en la capacidad de adhesión. La parte lipídica de la especie depende de las condiciones ambientales, de la edad del cultivo entre otras. La pared celular de la

especie *Candida albicans* varía en espesor y contiene varias capas, donde el número y morfología de las capas varían según factores ambientales, medio selectivos para su crecimiento entre otras.⁸

Candida puede observarse como células redondeadas u ovaladas de 3 a 5 μm , grampositivas y con un metabolismo principalmente aerobio. Es capaz de producir gemaciones y puede formar pseudomicelio o verdadero micelio o ambos y tiene una reproducción asexual por blastoconidios.^{9 10}

En la adhesión de *Candida* a distintas superficies juegan un papel primordial su membrana y sobre todo su pared. La membrana está constituida por una doble capa de diversos fosfolípidos entre los que destacan la fosfatidilcolina y la fosfatidiletanolamina, contiene también esteroides (sobre todo ergosterol y zimosterol). Esta membrana protege al citoplasma, regula la entrada y salida de solutos y facilita la síntesis de la pared celular. La pared celular proporciona rigidez y fuerza, y protege a la membrana celular de un shock osmótico, está compuesta en un 80 % al 90 % de hidratos de carbono y aproximadamente un 10 % de proteínas y glucoproteínas (incluyen enzimas involucradas en el crecimiento de la pared y proteínas estructurales); los polisacáridos de la pared celular pueden tener una estructura fibrilar y disponerse en múltiples capas o formar una matriz polisacárida amorfa. En la fase levaduriforme de *Candida albicans* se pueden distinguir tres capas en su pared, una capa externa constituida en un 80 % por manoproteínas,

una capa media de β (1,6) glucanos, y una capa interna con β (1,3) glucanos, manosa y quitina. ¹¹

Las especies de *Candida* crecen bien en medios de cultivo con agar, peptona, dextrosa, maltosa o sacarosa, a pH con rango entre 2,5 y 7,5 y temperatura que oscila entre 20 °C y 38 °C.¹²

Propóleo

El término propóleo proviene del griego (pro: delante en defensa de y polis: ciudad; delante de la ciudad, es decir, de la colmena), es un material multifuncional usado por las abejas en la construcción y mantenimiento de sus colmenas, es una sustancia resinosa, balsámica, gomosa de consistencia viscosa y color verde pardo, castaño o incluso negro, olor agradable y dulce.¹³

Las abejas recogen con sus mandíbulas, partículas resinosas de las yemas, brotes y peciolo de las hojas de diferentes vegetales, y una vez dentro de la colmena mezclan con cera y secreciones salivares para obtener el propóleo. Las abejas recubren las paredes internas de sus colmenas con una delgada capa de propóleo con la finalidad de reparar o proteger la colmena de invasores; dado que el propóleo es una sustancia embalsamadora multifuncional, de consistencia resinosa, balsámica, gomosa, viscosa, color verde pardo, castaño o incluso negro, es responsable de la baja incidencia de bacterias dentro de la colmena. ¹⁴

Generalmente encontramos, resinas y bálsamos aromáticos 50-55%, cera 7.5-35% aceites volátiles 10%, polen 4-5%, sustancias orgánicas y minerales 5%, ácidos orgánicos (ácido benzoico y ácido gallico) ácidos fenólicos (ácido cafeico, ácido cinámico, ácido ferulico) ácido inosilico, ácido p-cumarico, aldehídos aromáticos (vainilla isovainilla) cumarinas (esculetol, escopoletol) flavonoides, flavonas (acacetina, crisina amarilla, pectolinarigerina, tectocrisina) flavonoles (galangina, izalqinina, kaempferido, quercetina, ramnocitrina) flavononas (pinostrobina, sakuranetina) flavonoles (pinobanksina), minerales (aluminio, plata, bario, boro, cromo, cobalto, cobre, estaño, hierro, magnesio, manganeso, molibdeno, níquel, plomo, selenio, silicio, estroncio, titanio, vanadio, zinc) vitaminas (pro-vitamina A, vitamina B1, B2, B3).¹⁴

Las propiedades enunciadas mundialmente son, antibacteriana (bactericida y antibacteriostática), antimicótico, antiolesterolemica, antiparasitaria, antiinflamatoria, antioxidante, antitóxica, antialérgica, analgésica, anestésica, antituberculosa, antiviral, citostática, desodorante, epitelizante, estimulantes de la inmunogénesis, fitoinhibidora, hipotensora, termoestabilizadora (antipirética).¹⁴

La actividad antimicrobiana de este compuesto es más activa contra bacterias Gram positivas que contra bacterias Gram negativas; sin embargo, se ha demostrado su carácter inhibitorio en microorganismos bucales Gram negativos involucrados en procesos cariogénicos y periodontopatogénicos con *Streptococcus mutans*.¹⁵

El mecanismo de la actividad antimicrobiana del propóleo es complejo y puede ser atribuido al sinergismo entre algunos de sus compuestos, tales como flavonoides, ácidos aromáticos, ácidos grasos, ésteres, hidroxiácidos, sesquiterpenos y otros compuestos fenólicos presentes en su composición.¹⁵

Estudios han demostrado que los flavonoides tienen actividad antifúngica y antibacteriana, por lo tanto, el propóleo se usa contra las infecciones microbianas, entre los flavonoides probados para infecciones antimicrobianas los más efectivos son la galáina y pinocembrina, mientras que algunos ácidos fenólicos mostraron actividad antifúngica. Por lo tanto, el ácido fenol, junto con los aceites esenciales y los flavonoides, pueden considerarse las sustancias de propóleo más activas contra las bacterias y los hongos. Su estudio científico se inició en la década de los 40 y se ha ido intensificando en la medida en que ha podido descifrarse su compleja composición y se han descubierto nuevos aspectos de su actividad biológica, que permiten su uso en diversas áreas como la medicina, la biología y la industria, múltiples reportes han destacado que el propóleo es relativamente no tóxico y tiene efectos en parásitos, propiedades antitumorales y regenerador de tejidos además de ser buen cicatrizante, entre otros.¹⁵

En cuanto a su actividad antifúngica, se han restringido casi exclusivamente al género *Candida* considerando que los sesquiterpenos, especialmente el bisabolol y

flavononas (pinocembrina) son los principales compuestos responsables de esta actividad.¹⁹

2.1.2. Clorhexidina

La clorhexidina es una sustancia desinfectante de acción bactericida y fungicida, pertenece al grupo de las biguanidas. en sus concentraciones de 0,2%, 0,12% y 0,10%, es ampliamente activa contra bacterias Gram positivas, gram negativas, anaerobias facultativas y aerobias y en menor medida, contra hongos y levaduras, no se han descrito efectos tóxicos, debido a aplicación tópica o por ingestión, tampoco hay evidencia de teratogenia en modelos animales, no se ha observado resistencia bacteriana por hongos, levaduras o virus.^{20 21 22}

Debido a sus características de solubilidad, es un agente que desestabiliza y penetra la membrana de las células bacterianas precipitando el citoplasma e interfiriendo con la función de la membrana celular, inhibiendo la utilización de oxígeno, esto ocasiona una disminución de los niveles de ATP y posteriormente la muerte celular, actúa sobre la membrana citoplasmática con un defecto máximo en 20 segundos y un posterior efecto residual, previniendo el crecimiento de los microbios durante 29 horas. A bajas concentraciones se exhibe un efecto bacteriostático, y a altas concentraciones es bactericida, ya que induce precipitación de proteína citoplásmica y ácidos nucleicos.^{21 22}

Farmacocinética

Al final de un solo enjuague con clorhexidina, alrededor del 30% del ingrediente activo permanece en la mucosa oral y se ingiere un porcentaje insignificante, la propiedad catiónica de la clorhexidina minimiza su absorción a través de la piel y las mucosas, incluidos aquellos que recubren el tracto gastrointestinal. La clorhexidina no se metaboliza y es excretado principalmente a través de la materia fecal.²²

Farmacodinamia

El gluconato de clorhexidina se une a la pared celular de bacterias negativamente cargadas y tiene, una acción bacteriostática, a bajas concentraciones alterando el balance osmótico de la célula de bacteria, promueve la liberación de moléculas de bajo peso (potasio y fósforo) desarrolla, una acción bactericida, en altas concentraciones causa muerte celular por citólisis, su capacidad de aumentar la permeabilidad de la membrana celular de bacterias da como resultado la liberación de los principales componentes intracelulares, incluyendo potasio, alterando así la estructura de la proteína de la célula y causando la precipitación/coagulación del citoplasma proteínas. La acción bactericida es más efectiva contra los cocos Gram-positivos y más débiles en caso de Gram-negativos.²²

Otras indicaciones

La actividad *in vitro* de clorhexidina contra *Candida albicans* y otras especies de *Candida*, hace que se recomiende su uso para prevención de la candidiasis, así

como en el manejo de formas leves y moderadas de la enfermedad, especialmente en presencia de estomatitis protésica. También es recomendado para la limpieza de dentaduras postizas, sumergiéndolo en la solución por unos minutos.^{23 24}

2.3. Definición de términos básicos

Inhibición: suspender transitoriamente una función o actividad del organismo mediante la acción de un estímulo adecuado.²⁵

CAPITULO III: HIPOTESIS Y VARIABLES DE LA INVESTIGACION

3.1. Formulación de hipótesis principal y derivada

Tanto gluconato de clorhexidina al 0,12% como el extracto etanólico de propóleo al 80% ejercerán un efecto inhibitorio *in vitro* sobre *Candida albicans*.

3.1. Variables; dimensiones e indicadores y definición conceptual y operacional

3.1.1. Variable independiente

Definición conceptual de la variable: Agentes antimicrobianos

Son agentes químicos que se usan para eliminar microorganismos orales de diferentes formas, al producir muerte celular, al inhibir la reproducción microbiana, al inhibir el metabolismo celular; La mayoría de los agentes antimicrobianos, son bactericidas, aunque algunos son bacteriostáticos.²²

3.1.2. Variable dependiente

Definición conceptual de la variable: Efecto inhibitorio sobre *Candida albicans*

Consiste en suspender por un lapso de tiempo las funciones orgánicas de los microorganismos como *Candida albicans*.⁸

3.1.1 Operacionalización de Variables

VARIABLES	DEF.OPERACIONAL	INDICADOR	ESCALA DE MEDICION	TIPO DE VARIABLE
Agentes antimicrobianos	Se extraerá el extracto etanólico de Propóleo al 80% y se diluirá Gluconato de Clorhexidina del 2% al 0,12%.	Clorhexidina (0,12%) Metilparabeno (0.1%) Propóleo (80%) Alcohol (80%)	nominal	Cualitativa
Efecto Inhibitorio sobre <i>Candida albicans</i>	Teniendo en cuenta los UFC/ml basales al inicio, se observará si tendrán un efecto inhibitorio cuando los resultados sean menores que 0 UFC/ml y no tendrá un efecto inhibitorio cuando sea mayor que 0 UFC/ml	Si No	nominal	Cuantitativa

CAPITULO IV: METODOLOGIA

4.1. Diseño metodológico

El diseño de la investigación es experimental, porque se estableció una relación causa y efecto

Según la cronología el estudio es prospectivo porque la recolección de datos se realizó luego de planificar el estudio.

4.2. Diseño muestral

Población

Placas Petri conteniendo *Candida albicans*

Muestra

Se determinó el tamaño muestral mediante la fórmula para comparar medias.

$$n = \frac{2(Z\alpha + Z\beta)^2 * S^2}{d^2}$$

n = tamaño de muestra

Z α = valor Z correspondiente al riesgo deseado

Z β = Valor Z correspondiente al riesgo deseado

S² = Varianza poblacional

d = precisión o error máximo permisible

dónde: Z α = 1.96 y Z β = 0.84

entonces: asumiendo que $S = 0.6$ d

por lo tanto: $n = 9.4 \approx 10$

4.3. Técnicas e instrumento de recolección de datos validez y confiabilidad

Obtención de cepa *Candida albicans*

La cepa ATTC90028 *Candida albicans* estuvo brindada por la Universidad Nacional de Trujillo.

Reactivación de los cultivos

Se procederá a sembrar una asada del cultivo puro en un tubo de ensayo conteniendo 5 ml Agar Sabourad inclinado.

Evaluar curva de crecimiento

Se determinó en que tiempo la levadura ingresa a su fase logarítmica o fase exponencial, ya que es en esta fase donde los microorganismos crecen y se dividen a la velocidad máxima posible que les permite su potencial genético.

Preparación de las diluciones

- a) Se colectará la biomasa con solución salina fisiológica estéril, teniendo como referencia el tubo número 3 del nefelómetro de MacFarland.
- b) Se colocará los tubos en una gradilla, en condiciones de asepsia adicionarles 9.0 ml del diluyente a cada uno.
- c) Se rotulará los tubos con las diluciones 10^{-1} a 10^{-8}

Inoculación y vertido en placa

El Agar Sabourad se fundirá previamente y se mantendrá en baño maria a 45°C hasta el momento de su uso.

- a) Con una pipeta limpia y estéril se tomará 1ml de las 3 últimas diluciones, se dejará caer el contenido, en el centro de la caja petri marcada con la dilución correspondiente. En condiciones de asepsia, se añadirá a cada una de las cajas petri inoculadas de 15 a 20 ml del agar Sabourad previamente fundido
- b) Se colocará las cajas petri en la superficie de la mesa y se las moverá suavemente en las siguientes direcciones: en el sentido de las manecillas del reloj, describiendo círculos, se repetirá el movimiento en sentido lateral. Se realizará los movimientos seis veces en cada dirección.
- c) Se dejará solidificar el medio, se invertirá las cajas petri e incubará a la temperatura adecuada para cuantificar los microorganismos.
- d) Después de la incubación, se observará el efecto de dilución. Cuando éste sea aparentemente, se seleccionará las placas petri que muestren entre 30 y 300 colonias.
- e) Se colocará la caja petri en la cámara cuenta colonias, con la tapa hacia abajo y la base hacia arriba y se marcará cada colonia con plumín o lápiz graso.

- f) Calcular la cantidad de microorganismos por mililitro o gramo de la muestra con la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Promedio de colonias contadas} \times \text{Reciproco de la dilución}}{\text{Volumen incluido en caja}} = \text{UFC/mL}$$

Soluciones inhibitorias de *Candida albicans*

Propóleo

Con ayuda de un apicultor se consiguió el propóleo proveniente de Yantaló provincia de Moyobamba capital de la región San Martín, el cual posteriormente se machacó y se puso a macerar 15 días con etanol al 80% y se mantuvo en temperatura ambiente en un lugar fresco y alejado de la luz, luego se procedió a filtrar varias veces con papel filtro whatman número 40, luego se sometió a estufa a 50°C para extraer el etanol, hasta observar una delgada capa de propóleo como producto sin etanol.

Clorhexidina

Con la ayuda de un químico farmacéutico se consiguió clorhexidina al 2% y se procedió a su dilución teniendo en cuenta que los tubos de ensayo donde se hizo las diluciones fue de 2 ml en total incluyendo los 25 ul de inóculo y 1855 ul de caldo de cultivo, determinamos que para tener clorhexidina de 0,12% usamos 120 ul de gluconato de clorhexidina al 0,12%.

Evaluación antimicrobiana

Para la comparación de los antimicrobianos, en este caso el extracto etanólico de propóleo al 80% y gluconato de clorhexidina al 0,12% se siguieron los siguientes pasos:

Primero ya teniendo nuestra muestra basal, se procedió a tomar muestras de la curva de crecimiento en fase logarítmica, debido a que en esta fase la población de levadura asciende a unas 10^9 células por ml.

Se utilizaron 5 tubos de ensayo, el primero contenía Caldo Sabouraud, en este se procedió a poner 25 ul de inóculo con presencia de *Candida albicans*, 1975 ul de medio de cultivo, para controlar el crecimiento sin una sustancia inhibitoria.

En el segundo tubo de ensayo se colocó 25 ul de inóculo con presencia de *Candida albicans*, 1075 ul de caldo de cultivo y 900 ul de solución de propóleo al 80%

En el tercer tubo de ensayo se colocó 25 ul de inóculo con presencia de *Candida albicans*, 1075 ul de caldo de cultivo y 900 ul de alcohol como sustancia inhibitoria.

En el cuarto tubo de ensayo se colocó 25 ul de inóculo con presencia de *Candida albicans*, 1855 ul de caldo de cultivo y 120 ul de gluconato de clorhexidina.

En el quinto tubo de ensayo se colocó 25 ul de inóculo con presencia de *Candida albicans*, 1959 ul de caldo de cultivo y 25 ul de metilparabeno.

Se procedió a evaluar en 12 y 24 horas, y a observar las diferencias entre ambas soluciones, el efecto que tuvieron ambos antifúngicos en *Candida albicans* a medida pasó el tiempo.

Instrumento de medida

Cámara de recuento

Se utilizó para hacer el recuento de cada colonia, donde se colocó un solo organismo originalmente, con lo que el número de colonias en la placa es igual al número de organismos en el volumen de líquido existente en la placa. Esta concentración se extrapoló a partir de la dilución practicada sobre el cultivo original, eso nos sirvió para estimar la concentración de organismos existentes en el cultivo inicial.

Validez y confiabilidad

El instrumento de cámara de cuenta colonias es altamente confiable ya que es muy exacto a la hora de medir el crecimiento de los microorganismos de forma directa, la cámara de recuento es fácil, barato y relativamente rápido. ²⁶

4.4. Técnicas de procesamiento de la información

Los datos obtenidos de las 12 y 24 horas de evaluación, fueron trasladados a base de datos en Excel XP una vez ingresados, ordenados y tabulados.

4.5. Técnicas estadísticas utilizadas en el análisis de la información

Se utilizó estadística descriptiva, mediante la obtención de promedios.

CAPITULO V: ANALISIS Y DISCUSION

5.1. Análisis descriptivo, tablas de frecuencia, gráficos, dibujos, formas, etc.

Tabla 1. Recuento de *Candida albicans* en UFC/mL en caldo Sabouraud 4% glucosa para los diferentes sistemas de tratamiento encubado a 36°C durante 12 horas.

Sustancia	Crecimiento
	12 horas (UFC/mL)
Propóleo 80%	0.0×10^0
Clorhexidina 0.12%	0.0×10^0
Alcohol 80°	8.7×10^9
Metilparabeno 0.1%	8.2×10^9

Inóculo inicial 7.1×10^6 UFC/mL

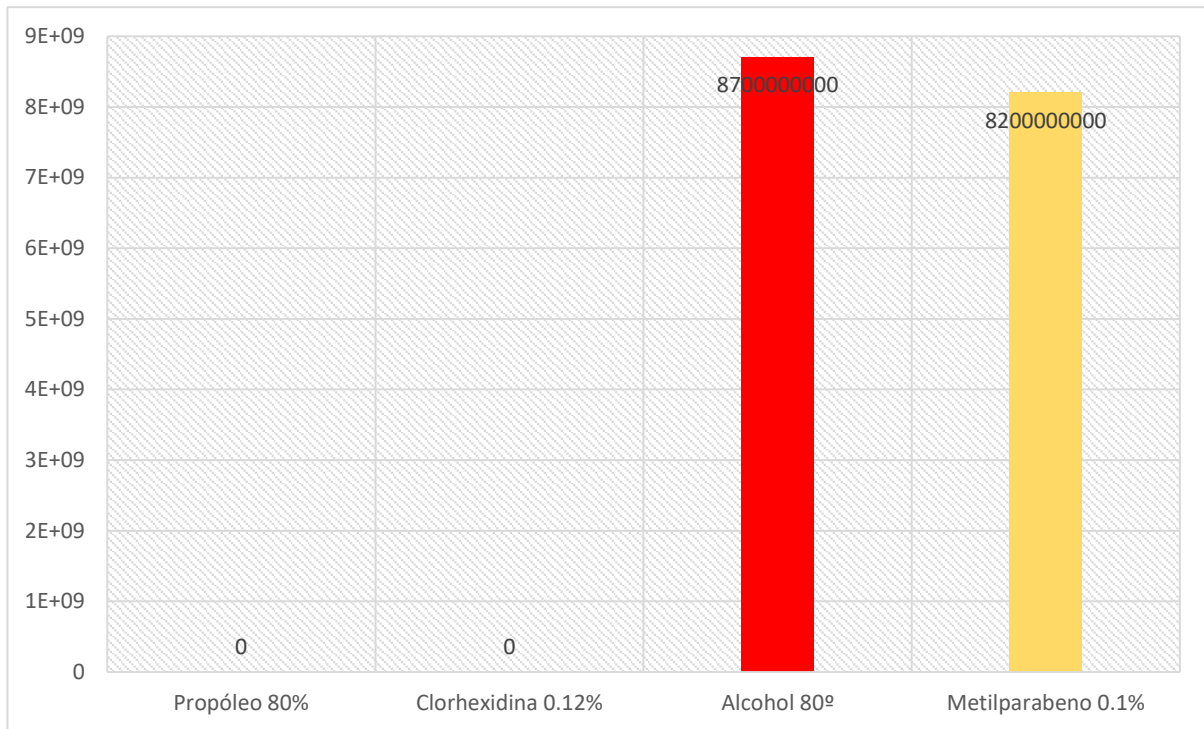
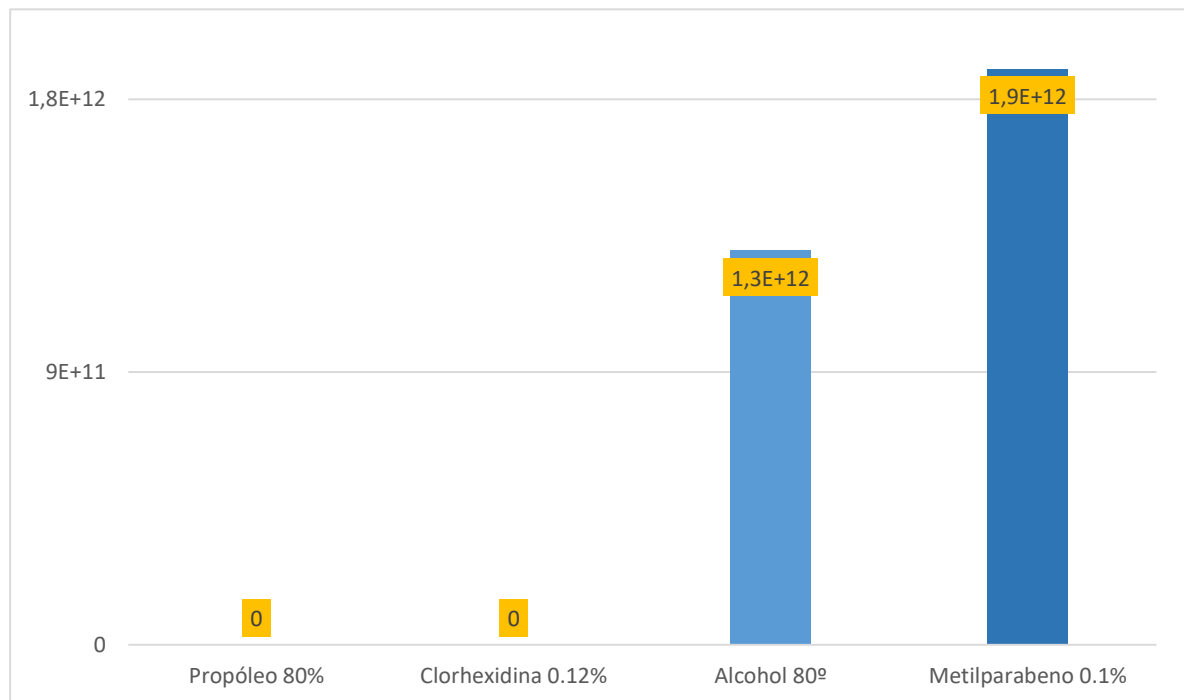


Grafico 1. Efecto inhibitorio del extracto etanólico de propóleo al 80% y de clorhexidina al 0.12% sobre el crecimiento de *Candida albicans* en caldo Sabouraud 4% glucosa, encubado a 36°C durante 12 horas.

Tabla 2. Recuento de *Candida albicans* en UFC/ ml en caldo Sabouraud 4% glucosa para los diferentes sistemas de tratamiento encubado a 36° C durante 24 horas.

Sustancia	Crecimiento
	24 horas (UFC/ml)
Propóleo 80%	0.0×10^0
Clorhexidina 0.12%	0.0×10^0
Alcohol 80°	1.3×10^{12}
Metilparabeno 0.1%	1.9×10^{12}
Inóculo inicial 7.1×10^6 UFC/mL	

Grafico 3. Efecto inhibitorio del extracto etanólico de propóleo al 80% y de clorhexidina al 0.12% sobre el crecimiento de *Candida albicans* en caldo Sabouraud 4% glucosa encubado a 36°C durante 24 horas.



5.2. Discusión

El propóleo es un material multifuncional usado por las abejas en la construcción y mantenimiento de sus colmenas, es una sustancia resinosa, balsámica, gomosa de consistencia viscosa y color verde pardo, castaño o incluso negro, olor agradable y dulce, con propiedades antibacterianas, antifúngicas, antivirales, entre otros¹³, por el cual el presente estudio tuvo como finalidad comparar el efecto inhibitorio *in vitro* entre el extracto etanólico de propóleo al 80% y gluconato de clorhexidina al 0,12% sobre el crecimiento de *Candida albicans*, para ello primero se evaluó la curva de crecimiento de la levadura con la finalidad de analizar cómo crecen los cultivos bacterianos para poder trabajar con ellos.

En el estudio se sometió a *Candida albicans* a una concentración de extracto etanólico de propóleo al 80% y gluconato de clorhexidina al 0,12% y obtuvimos como resultado a 12 horas, que el extracto etanólico de propóleo al 80%, resultó ser efectivo contra *Candida albicans*, observándose un crecimiento de 0.0×10^0 UFC/ml, en cuanto a gluconato de clorhexidina al 0,12% tuvo los mismos resultados con un 0.0×10^0 , en ambos casos hubo ausencia de crecimiento, a diferencia de alcohol de 80% con un crecimiento de 8.7×10^9 y metilparabeno con un crecimiento de 8.2×10^9

A las 24 horas se encontró el mismo resultado inhibitorio contra *Candida albicans* con 0.0×10^0 tanto para extracto etanólico de propóleo al 80% como para gluconato de clorhexidina al 0,12%, siendo diferente los demás sistemas como alcohol por ejemplo con un 1.3×10^{12} o metilparabeno con un 1.9×10^{12} , a diferencia de Gil y col³¹ quienes concluyeron que el extracto etanólico de propóleo es fungistático total contra *Candida albicans* al 15% en 48 horas y al 8% en 24 horas y fungicida al 11% en 24 horas y al 19% en 48 horas contra el crecimiento de *Candida albicans*, no

dejando de lado a Huaytalla y Col²⁵ quienes en su investigación *in vitro* tuvieron como resultados que el extracto etanólico de propóleo al 30% es más efectivo que la clorhexidina al 0,12% para el control en este caso de *Lactobacillus acidophilus* haciendo hincapié en las concentraciones de propóleo que usaron que son mucho menores de lo que en esta investigación se llegó a usar.

Por otro lado, Ramírez³ quien determinó el efecto inhibitorio del extracto etanólico de propóleo sobre *Streptococcus mutans* y *Candida albicans* quien utilizó las concentraciones 25%, 50%, 75% y 100% de propóleo tuvo como resultado que el halo inhibitorio para *Streptococcus mutans* al 100% es 14.25 mm; mientras que para *Candida albicans* el halo de inhibición al 100% fue de 11.8 mm. Y concluyó que el propóleo etanólico a mayores concentraciones presenta mayor actividad inhibitoria para el *Streptococcus mutans* y en menor efecto inhibitorio sobre *Candida albicans*, si bien es cierto en esta investigación no se evaluó la diferencia inhibitoria que tiene el propóleo con otras bacterias a parte de *Candida albicans* podemos coincidir en el efecto que tiene el propóleo a altas concentraciones, en este caso a 80% que resultó ser fungicida, coincidimos también con De la cruz³¹ quien evaluó el efecto antimicótico de cuatro concentraciones de extracto etanólico de propóleo al 25%, 50%, 75% y 100% sobre el crecimiento de *Candida albicans* obteniendo como resultado que la actividad antimicótica del extracto etanólico de propóleo de mayor efecto fue la de 100%.

Teniendo en cuenta que nuestra investigación no busca determinar el efecto fungicida o fungistático del propóleo y gluconato de clorhexidina; si se buscó la diferencia de inhibición para ambos casos, los resultados obtenidos nos permiten determinar los beneficios, a la hora de escoger uno de los productos para la eliminación de *Candida albicans*, teniendo en cuenta la resistencia que esta posee.

Como control se utilizó alcohol al 80% y metilparabeno al 0.1% obteniendo como resultado el crecimiento de *Candida albicans*, por el cual se comprobó en primer lugar que el efecto inhibitorio de extracto etanólico de propóleo es producido por el propóleo mas no por el alcohol y en segundo lugar que el metilparabeno que usualmente se usa como excipiente en solución de clorhexidina, para alargar el tiempo de vida de la misma, no tiene acción inhibitoria sobre *Candida albicans* ya que el crecimiento se produjo durante las 12 como a las 24 horas.

Por otro lado, entre los factores que pueden influir para obtener resultados tan variables esta la composición química del propóleo, que está íntimamente relacionado con el origen botánico utilizado por las abejas para la fabricación del propóleo y a su vez relacionado con el área geográfica y las condiciones climáticas del mismo.²⁸ como bien lo menciona Joya y Col²⁹ quienes evaluaron la actividad fungistática y fungicida de extractos etanólicos de propóleos sobre el crecimiento *in vitro* de cepas del género *Candida*, usando diferentes tipos de propóleo entre ellos, venezuela y de tres regiones del mundo, cepas del complejo *C.albicans*, *C. guilliermondi*, *C. krusei* y *C.tropicalis* se enfrentaron a distintas concentraciones de extractos etanólicos de propóleos, teniendo como resultado que los propóleos de mayor actividad biológica fueron los de Alemania e Italia (10,2 mg/ml), seguidos por Venezuela (15,6 mg/ml) y España (18,8 mg/ml) demostrando que el poder inhibitorio del propóleo es diferente en cada país o ciudad del mundo

El presente trabajo demostró que el extracto etanólico de propóleo proveniente de la zona de San Martín, tiene efecto inhibitorio *in vitro* fungicida sobre las levaduras, a una concentración del 80%, los resultados que se ha podido obtener demuestran que el propóleo es efectivo a altas concentraciones, según la literatura gracias a su alto contenido de flavonoides, ya que estos juegan un papel importante en la

defensa de las plantas de donde las abejas extraen estas resinas para después convertirse en propóleo, además este mismo sirve como señal química o marcadores florales que sirven para guiar a las abejas al néctar, facilitando indirectamente la polinización, indicando que la planta que los contiene es apropiada para su alimentación, los flavonoides aparecen en la savia de las plantas, en la miel de las abejas, y en la resina, de ahí que el propóleo fabricadas por abejas sean ricas en flavonoides.³⁰

CONCLUSIONES

Se concluye que no hay diferencia en el efecto inhibitorio *in vitro* entre extracto etanólico de propóleo al 80% y gluconato de clorhexidina al 0,12% sobre *Candida albicans*.

Al determinar el efecto inhibitorio *in vitro* de clorhexidina al 0,12% sobre *Candida albicans* en 12 y 24 horas se observó que tuvo un efecto, fungicida a esta concentración.

Al determinar el efecto inhibitorio *in vitro* de propóleo al 80% sobre *Candida albicans* en 12 y 24 horas se pudo concluir que a esta concentración tiene un efecto fungicida, observándose ausencia de crecimiento fúngico en las placas Petri.

RECOMENDACIONES

Después de los resultados obtenidos en la presente investigación sobre el efecto inhibitor del propóleo al 80% y gluconato de clorhexidina al 0,12% se recomienda más estudios *in vivo* para observar cómo funciona en cavidad bucal, teniendo en cuenta la saliva y los demás microorganismos que en ella habitan.

Teniendo en cuenta que los flavonoides son los responsables de la actividad antimicrobiana del propóleo, los nuevos estudios que se hagan podrían dirigirse a investigar los demás componentes que las abejas producen como el polen, siempre teniendo la intención de utilizar la medicina natural, sin químicos ni conservantes o excipientes que como el en el caso de la clorhexidina son muy efectivos, pero que a la larga podrían afectarnos y traernos consecuencias.

Investigar más al propóleo de la zona de san Martín, ya que como hay abundante vegetación, hay mucha polinización, significando que el propóleo es más rico en flavonoides, y eso a su vez con muchos más beneficios contra los microorganismos que afectan nuestra salud oral.

FUENTES DE INFORMACION

1. Espinosa P.A, Efecto antifúngico *in vitro* del extracto de Propóleo ecuatoriano comparado con la nistatina sobre *Candida albicans*. [Tesis]. Ecuador: Universidad Central del Ecuador; 2017.
2. Lobaina T. Métodos cromogénicos y fluorogénicos para el diagnóstico de especies de *Candida* de relevancia clínica. [tesis]. Habana: Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”; 2010.
3. Ramírez T, Vilcapaza MN, Efecto inhibitorio del extracto de Propóleo sobre los microorganismos *Streptococcus mutans* y *Candida albicans* que colonizan la cavidad oral. [Tesis]. Puno: Universidad Nacional del Altiplano; 2016.
4. Navarro J.S.A, Lezcano MR, Mandri MN, Gili MA, Zamudio MA. Acción anticariogénica del Propóleo. Av. Histología y embriología. 2018; 58 (1): 50-53.
5. Ismael L, Reyes Y, Campos P, Saragoni F, Efecto inhibitorio en la placa microbiana y propiedades antibacterianas de enjuagatorios de clorhexidina. Av. Periodon Implan. 2003; 15(1): 19-24.
6. Armenta MG, Serrano P, García R, Días A, Efecto antimicrobiano de la clorhexidina en odontología. Rev. Latinoam, 2016; 8(2): 31-35.
7. Untiveros G, Sacsquispe S, Zurita S. Efecto antifúngico *in vitro* sobre el crecimiento en *Candida albicans*, *Candida glabrata* y *Candida Krusei* expuestas al propóleo de Oxapampa a las 24, 48 y 120 horas. Rev de investigación de la Universidad Norbert Wiener. 2014. (3) :1-29.

8. Cevallos K. Estudio comparativo in-vitro de la eficacia antimicótica de la clorhexidina al 0.12% y el microondas en la eliminación de cepas de *Candida albicans* adheridas a dispositivos de acrílico termocurado. [Tesis]. Ecuador: Universidad Central del Ecuador; 2016.
9. Pasquel IE. Eficacia del propóleo del cantón baños en la inhibición de *Candida albicans* en acrílico para bases de prótesis totales, estudio *in vitro*. [Tesis]. Ecuador: Universidad Central del Ecuador; 2017.
10. Calderon M. Eficacia de diferentes agentes desinfectantes en la remoción de *Candida albicans*, *streptococcus mutans* y *Enterococcus faecalis* adheridos a resina acrílica de termocurado. [Tesis]. Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marco; 2014.
11. Liébana J. Microbiología Oral. Características generales de los hongos patógenos humanos. Mc Graw.Hill Interamericana de España. 1ª Ed. Madrid; 1995. P 362-75.
12. Bermejo A. Medicina Bucal Vol. I. Madrid: Ed. Síntesis S.A.; 1998. P 139-5
13. Premoli G, Laguado P, Díaz N, Romero C, Uso del Propóleo en odontología. Acta odontológica venezolana 2010; 48(2):3.
14. Ponce A.A, Millones P.A, Efectividad Antibacteriana de productos naturales frente a microorganismos patógenos de la flora oral. Ciencias de la salud. 2015; 2(2): 530-537.
15. Lozina L, Acosta O, Boehringer S, Teibler P. Acción del propóleo sobre levaduras (*Malassezia Pachydermatis*) asociadas a otitis externas en caninos. Comunic científicas y tecnolog. 2004; 021:2-4.
16. Cafarchia C, Delaurentis N, Milillo MA, Losacco V. Antifungal Activity of Apulia región propolis. Parasitología. Dec. 1999, 41(4):587-90.

17. Londoño O, Penieres G, García C, Carrillo G. 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.
18. Cozina L, Boehringer S, Aquino M, Acosta O. Eficacia del propóleo sobre *Malasszia pachydermatis* correlación de distintas técnicas *in vitro*. *Acta Farm Bonaerense*. 2006, 25(4):560-563.
19. López J, Ubillos M. Estandarización del propóleo de la provincia de Oxapampa, departamento de Pasco Perú como materia prima para la utilización a nivel industrial. [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2004.
20. Varoni E, Tarce M, Lodi G, Carrasi A. Chlorhexidine (CHX) in dentistry. State of the art. *Minerva stomatol*. 2003; 61: 399-419.
21. Louis G, Depaola DDS. Safety and Efficacy of Antimicrobial Mouthrinses in clinical practice. Source: *Journal of Dental Hygiene*, 2007; 81(5):25-30.
22. Lim K-S, Kam PCA. Chlorhexidine – pharmacology and clinical applications. *Anaesth intensive care* 2008;36: 502-12.
23. Shklar G, Carranza FA, *Clinical Periodontology*. 9 edición. Los angeles: Saunders; 2006.
24. Russell D, Path FR, Pharmaceutical Microbiology Research Laboratory, Welsh School of Pharmacy, University of Wales Institute of Science and Technology. 1986; 13(1): 28-33.
25. Huayta R, Gálvez C, Carhuapoma M, Alvarez M. Efecto inhibitor in vitro del extracto etanólico de propóleo al 15% y 30% frente a cepas de *Lactobacillus acidophilus*. *Rev Estomatol Herediana*. 2018; 28 (1): 36-43.

26. Ingraham JL, Maaløe O, Neidhardt FC. Microbial growth. Growth of the bacterial cell. Sunderland. Sinauer Associates; 1983.
27. Maureira N, Viera P, Fernandez A, Urrejola M, Bravo C, Mardones F. Susceptibilidad de cepas de *Candida* Oral a extracto etanólico del propóleo chileno de Olmué. Int. J. Odontoestomat. 2017; 11 (3): 295-303.
28. Bosio K, Avanzini C, D' Avolio A, Ozino O, Savoia D. *In vitro* activity of propolis against *Streptococcus pyogenes*. Lett Appl Microbiol 2000; 31:174-7
29. Joya M, Gil M, Bastidas G. Actividad fungistática y fungicida de extractos etanólicos de propóleos sobre el crecimiento *in vitro* de cepas del género *Candida*. Tecnología en marcha. 2017. Vol. 30(3): 3-11.
30. Cartaya O, Reynaldo I. Reseña bibliográfica Flavonoides: Características Químicas Y Aplicaciones. Cultivos tropicales. 2001; 22(2): 5-14.
31. De la cruz. Actividad antimicótica del extracto etanólico de propóleo sobre el crecimiento *in vitro* de *Candida albicans*. [Tesis]. Trujillo: Universidad Nacional de Trujillo; 2013
32. Gil , Joya, González , Figueroa, Perozo. Efecto fungistático y fungicida del extracto etanólico de propóleos sobre especies de *candida*. [Tesis]. Venezuela: Universidad de Carabobo; 2015.

ANEXOS

Anexo 1: Carta de presentación



Trujillo 04 de octubre del 2018

Mblgo. Adderly Roland Benites Murrieta

**Docente del departamento de Microbiología y parasitología de la
universidad Nacional de Trujillo**

De mi consideración:

Tengo el agrado de dirigirme a usted para expresarle mi respetuoso saludo y al mismo tiempo presentarme como alumna **FIGRELA VASQUEZ MONTENEGRO** con código **2012143583** de la Escuela Profesional de Estomatología- Facultad de Medicina Humana y Ciencias de la Salud- Universidad Alas Peruanas, quien me honro en dirigir, haciendo de su conocimiento la necesidad de poder trabajar en el laboratorio de la universidad de Trujillo para poder realizar el trabajo de investigación (tesis).

TITULO: EFECTO INHIBITORIO *IN VITRO* DEL EXTRACTO ETANOLICO DE PROPOLEO AL 80% Y GLUCONATO DE CLORHEXIDINA AL 0,12% SOBRE *CANDIDA ALBICANS*

Anticipo a usted mi profundo agradecimiento por la generosa atención que brinda a la presente.



Fiorela Vasquez Montenegro



Mblgo. Adderly Roland Benites Murrieta
COD: 6256



UNIVERSIDAD NACIONAL DE TRUJILLO
Facultad de Ciencias Biológicas
DECANATO



"Año del dialogo y la reconciliación Nacional"

Mblgo. Adderly Roland Benites Murrieta

Docente del departamento de Microbiología y parasitología de la universidad Nacional de Trujillo entrega la:

CONSTANCIA DE EJECUCION DE PROYECTO

La alumna **IORELA VASQUEZ MONTENEGRO** con código **2012143583** de la Escuela Profesional de Estomatología- Facultad de Medicina Humana y Ciencias de la Salud- Universidad Alas Peruanas se le emite la siguiente constancia por haber realizado satisfactoriamente la ejecución del Proyecto denominado "EFECTO INHIBITORIO *IN VITRO* DEL EXTRACTO ETANOLICO DE PROPOLEO AL 80% Y GLUCONATO DE CLORHEXIDINA AL 0,12% SOBRE *CANDIDA ALBICANS*" para los fines que estime conveniente.

Viernes 30 de noviembre del 2019

Anexo 4: instrumento de recolección de datos

		OBSERVACIONES DE LA MUESTRA EN CAMARA DE RECuento				
MUESTRAS	Concentr. UFC/ml		UFC/ ml Basales	UFC/ ml en 12 H	UFC/ ml en 24 H	DESCRIPCION
	1	Clorhexidina al 0,12% conteniendo <i>Candida albicans</i>	7,125x10⁶ UFC/mL	0 UFC/ml	0 UFC/ml	Ausencia de crecimiento en placas Petri de colonias durante el monitoreo en 12 y 24 horas
	2	Propóleo al 80% conteniendo <i>Candida albicans</i>	7,125x10⁶ UFC/mL	0 UFC/mL	0UFC/ml	Ausencia de crecimiento en placas Petri de colonias durante el monitoreo en 12 y 24 horas
	3	Alcohol al 80% conteniendo <i>Candida albicans</i>	7,125x10⁶ UFC/mL	8.7 x 10 ⁹ UFC/mL	1.3x 10 ¹² UFC/mL	Crecimiento de colonias en placas Petri, durante el monitoreo en 12 y 24 horas.
	4	Metilparabeno (0.1%) conteniendo <i>Candida albicans</i>	7,125x10⁶ UFC/mL	8.2 x 10 ⁹ UFC/mL	1.9x 10 ¹² UFC/mL	Crecimiento de colonias en placas Petri, durante el monitoreo en 12 y 24 horas.

Anexo 5: Matriz de consistencia

Problema principal	Objetivos	Hipótesis principal	Variables	Metodología
<p>¿Cuál es la diferencia del efecto inhibitorio <i>in vitro</i> entre extracto etanólico de propóleo al 80% y gluconato de clorhexidina al 0,12% sobre <i>Candida albicans</i></p>	<p>General Comparar el efecto inhibitorio <i>in vitro</i> entre extracto etanólico de propóleo al 80% y gluconato de clorhexidina al 0,12% sobre <i>Candida albicans</i></p>	<p>Tanto gluconato de clorhexidina al 0,12% como el extracto de etanólico de propóleo al 80% ejercerán un efecto inhibitorio <i>in vitro</i> sobre <i>Candida albicans</i>..</p>	<p>Independiente Agentes antimicrobianos</p>	<p>Población: placas Petri conteniendo <i>Candida albicans</i> Muestra: 10 placas Petri por grupo</p>
<p>de al y de al sobre <i>Candida albicans</i>?</p>	<p>Específicos Determinar el efecto inhibitorio <i>in vitro</i> de clorhexidina al 0.12% sobre <i>Candida albicans</i> en 12 y 24 horas. Determinar el efecto inhibitorio <i>in vitro</i> del extracto etanólico de propóleo al 80% sobre <i>Candida albicans</i> en 12 y 24 horas.</p>		<p>Dependiente Efecto Inhibitorio <i>Candida albicans</i> Co- variable tiempo</p>	<p>Tipo de Investigación: Cuantitativa Método de investigación: Experimental Diseño de la Investigación: Experimental</p>
				<p>Técnica de recolección de Datos Método de dilución y vertido en placa Instrumento Cámara de recuento.</p>

Anexo 6: Fotografías

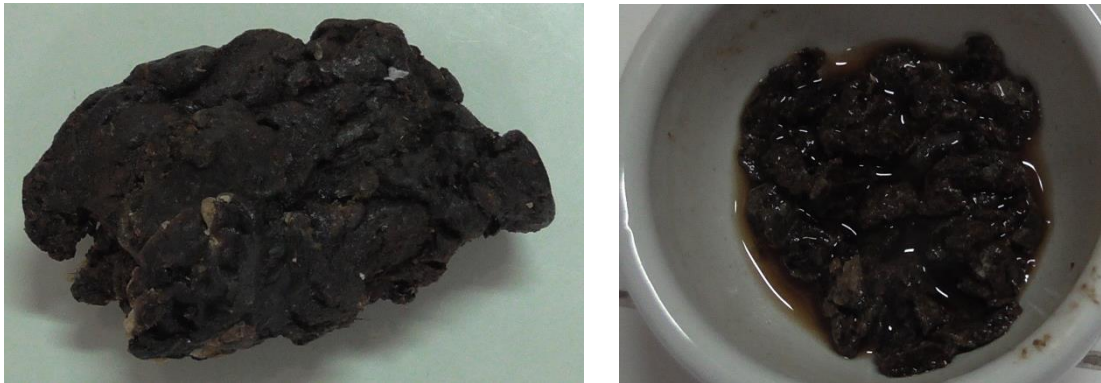


Figura 3. Machacado del propoleo con alcohol, para su posterior remojo con alcohol de 80°



Figura 4. Después del remojo de propóleo, pasamos a filtrarlo papel filtro whatman número 40 para dejarlo sin pulpa resinosa y posteriormente dejarlo en estufa a 50° para la evaporación del etanol y dejarnos solo el propóleo.



Figura 5. dilución de extracto etanólico de propóleo al 80% en alcohol de 80, después de la evaporación del etanol.



Figura 6. Cepas de *Candida albicans* brindado por la UNT



Figura 7. Preparación de Agar Sabouraut glucosado para hacer el sembrado de *Candida albicans* y esterilización de los materiales a utilizar

Figura 8. Los cinco sistemas. (1) Caldo sabouraud (2) Propóleo al 80% (3) Gluconato de clorhexidina (4) alcohol (5) Metilparabeno.

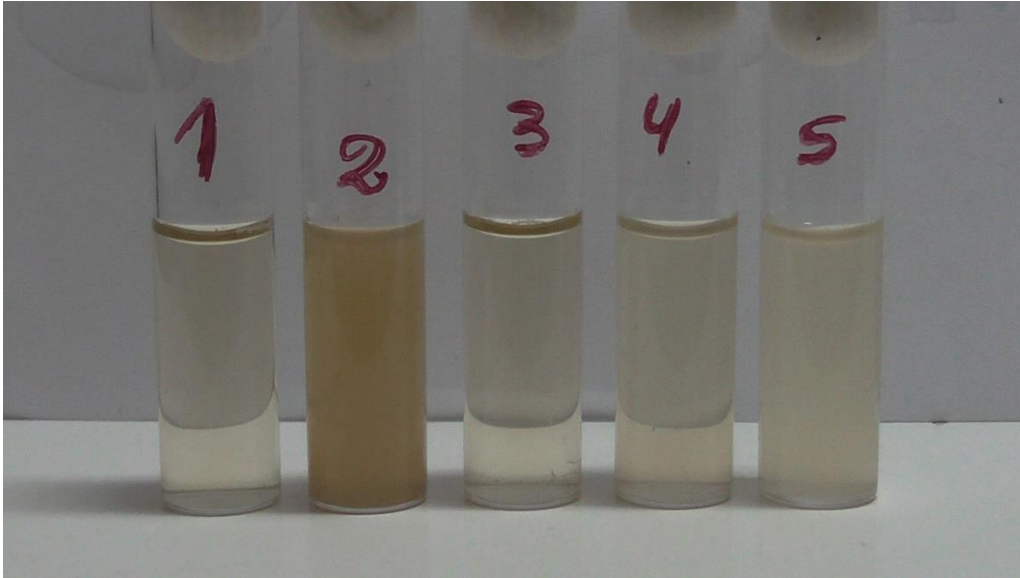
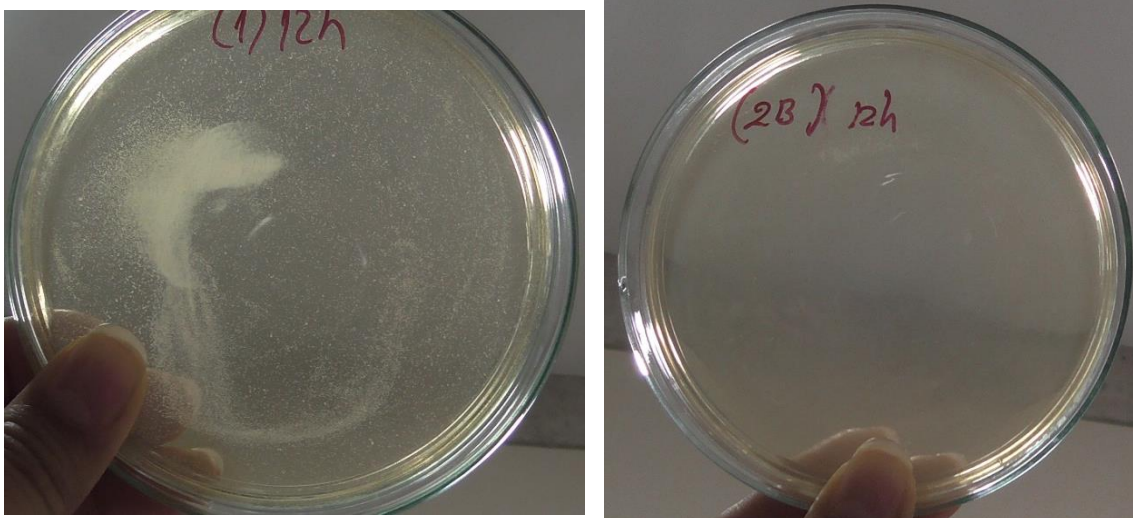


Figura 9. Agar Sabouraud sembrado en placa, vista en 12 horas, crecimiento normal de *Candida albicans* y placa 2 conteniendo propóleo al 80% y *Candida albicans*, no se observa crecimiento de cepas.



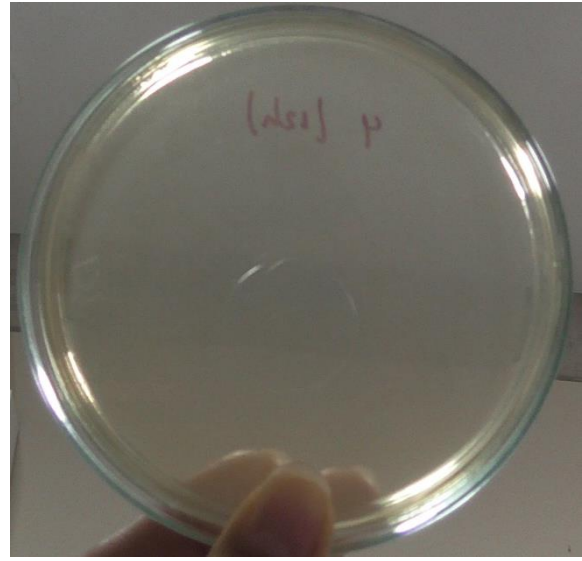


Figura 10. Placa numero 3 conteniendo alcohol, se observa el inicio del crecimiento de colonias de *Candida albicans* y placa numero 4 conteniendo clorhexidina, se observa la ausencia de crecimiento de colonias *Candida albicans*.

Figura 11. Placa numero 5 conteniendo metilparabeno, se observa crecimiento abundante de *Candida albicans*.

