



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA
LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO E INVESTIGACIONES
MICROBIOLÓGICAS “PROF. CELINA ARAUJO DE PÉREZ”
MÉRIDA-VENEZUELA

www.bdigital.ula.ve
**Evaluación de la actividad antifúngica de Extractos de flores
de *Calendula officinalis* L. sobre especies de *Candida
albicans* aisladas de la cavidad bucal de pacientes diabéticos
tipo 2**

Autor: Br. María Alejandra Rangel Ávila.
C.I: V- 17.340.909
Tutora: Prof. Elaysa J. Salas Osorio PhD.

Julio, 2019.



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA
LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO E INVESTIGACIONES
MICROBIOLÓGICAS “PROF. CELINA ARAUJO DE PÉREZ”
MÉRIDA-VENEZUELA

www.bdigital.ula.ve

**Evaluación de la actividad antifúngica de Extractos de flores
de *Calendula officinalis* L. sobre especies de *Candida
albicans* aisladas de la cavidad bucal de pacientes diabéticos
tipo 2**

**(Trabajo de grado como requisito parcial para optar al título de
Licenciada en Bioanálisis)**

Autor: Br. María Alejandra Rangel Ávila.
C.I: V- 17.340.909
Tutora: Prof. Elaysa J. Salas Osorio PhD.

Julio, 2019.

www.bdigital.ula.ve



Solo tú eres mi roca firme y por ser quien eres, el Grande y Majestuoso Rey, te honro porque sólo tú mereces el primer lugar, es por eso, que dedico a Dios éste logro que he podido culminar. Te amo

AGRADECIMIENTOS

Gracias Mi Señor Dios Todopoderoso por ser tu voz mi guía, le has dado fuerzas a mi corazón para soportar esta batalla y me llenaste de paciencia para esperar en ti lo que hoy en día es una victoria grande en mí vida y todo lo he obtenido gracias a tu gran Bondad. *“Yo, en cambio, te ofreceré sacrificios y cánticos de gratitud. Cumpliré las promesas que te hice. ¡La salvación viene del Señor!” Jonás 2:9*

A mis Padres Lucila y Alberto, gracias porque de sus corazones siempre expresaron palabras de ánimo, apoyo y fuerzas de seguir con la mirada siempre puesta en alcanzar el propósito de graduarme. Los amo!

Gracias Mami por ayudarme mientras estaba en mis actividades, por tu paciencia y por amarme. Te mereces esto y mucho más.

A mi esposo Vick Dubany por ser mi ayuda idónea, mi sostén, mi amigo, mi apoyo y por hacer sacrificios que han sido primordiales en tu vida por mí. Lo logré mi “Viejito” y no sólo es para mí sino también te pertenece a ti esta gran victoria. Te Amo.

A mis hijos Héctor Atrellu, Bárbara Sophia y Lucio Ignacio, mis tres suspiros de alegría y fuerza, que día tras día me hacen levantar por un mejor y hermoso caminar. Gracias mis niños por cada momento que me acompañaron sentaditos a mi lado mientras redactaba este proyecto, gracias mis chiquitines por entenderme y estar pendiente de mí. Los amo y la bendición de Dios esté siempre en ustedes.

A mis hermanos Gaby y Víctor, por su apoyo y aunque la distancia nos separe siempre los tengo en mi corazón y sé que pronto nos reuniremos.

A mi tutora Elaysa Salas por haber fijado su mirada en mí y en extender su mano generosa para ayudarme. Sigue adelante impartiendo de todos tus conocimientos y alcanzando grandes metas. Gracias.

A mi compañera de muchos años Prof. Yinec Varela y hoy por hoy una gran amiga, te agradezco por caminar conmigo en trayectos largos y cortos durante mi carrera. Dios te puso en mi camino para finalizar este gran proyecto, gracias por tu asesoría y de compartir conmigo ese gran conocimiento e ideas hermosas para hacer de esto un gran trabajo. Gracias por tu paciencia, generosidad y optimismo. Que Dios te siga bendiciendo y te lleve a cumbres muy altas de éxito. Te quiero.

A mis pastores Sobeida Cairo y Carlos Niño por recibir de ustedes esas oraciones que me levantaban y me daban fortaleza para seguir adelante. También a **Rubén, Olga, Carlita, Carlitos** hermanos de la iglesia por siempre apoyarme. Los bendigo

A la Prof. Kiralba Sánchez coordinadora del Laboratorio de Diagnóstico e Investigaciones Microbiológicas “Prof. Celina Araujo de Pérez” por abrirme las puertas de su espacio científico-académico y permitirme llevar a cabalidad mi investigación.

A la ilustre Universidad de Los Andes por abrirme las puertas de su majestuosa casa y brindarme los conocimientos que por siempre guardaré y pondré en práctica.

¡Gracias a todos!

**INDICE GENERAL**

INDICE DE TABLAS.....	viii
INDICE DE FIGURAS.....	xix
ÍNDICE DE ANEXOS.....	x
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT.....	xii
INTRODUCCIÓN.....	2
CAPITULO I: EL PROBLEMA.....	4
1.1.- Planteamiento del problema.....	4
1.2.- Formulación del problema.....	6
1.3.- Justificación.....	6
1.4.- Objetivos.....	7
1.4.1.- Objetivo general.....	7
1.4.2.- Objetivos específicos.....	7
CAPITULO II: MARCO TEORICO	8
2.1.- <i>Calendula officinalis</i> L.	8
2.1.1.- Taxonomía de la planta.....	8
2.1.2.- Características.....	8
2.1.3.- Composición química.....	9
2.1.4.- Usos de la planta.....	12
2.2.- Diabetes.....	13
2.2.1.- Generalidades.....	13
2.2.2.- Clasificación.....	14
2.2.3.- Epidemiología.....	16
2.2.4.- Principales manifestaciones infecciosas en la cavidad bucal en diabéticos	17
2.3.- Candidiasis.....	19
2.3.1.- Generalidades.....	19
2.3.2.- Epidemiología de la candidiasis.....	21
2.3.3.- Factores bucales que predisponen al padecimiento de candidiasis	23
2.3.3.1.- Factores locales.....	23
2.3.3.2.- Factores sistémicos.....	24
2.3.3.3.- Factores iatrogénicos.....	24
2.3.4.- Especies de <i>Candida</i> asociadas a manifestaciones bucales	24
2.3.4.1.- <i>Candida albicans</i>	25
2.3.5.- Clasificación de la candidiasis bucal.....	26
2.3.6.- Opciones terapéuticas para candidiasis bucal	29
2.3.7.- Plantas medicinales: opciones terapéuticas alternativas para la candidiasis bucal.....	30



2.4.- Métodos empleados para la evaluación de la actividad antifúngica	32
2.4.1.- Importancia	32
2.4.2.- Métodos para evaluar la actividad antimicrobiana.....	32
CAPITULO III: MARCO METODOLOGICO	37
3.1.- Tipo de investigación.....	37
3.2.- Sistema de variables.....	37
3.2.1.- Variable independiente.....	37
3.2.2.- Variable dependiente.....	37
3.3.- Hipótesis.....	37
3.4.- Instrumentos de recolección de datos.....	38
3.5.- Especímenes biológicos.....	38
3.6.- Procedimiento	39
3.6-1.- Reactivación de la colección de cepas y preparación del inóculo	39
3.6.2.- Actividad antifúngica.....	40
3.6.2.1.- Preparación de la solución stock del extracto.....	40
3.6.2.2.- Inoculación de las placas.....	40
3.6.2.3.- Determinación de la actividad antifúngica de los extractos.....	41
CAPÍTULO IV: RESULTADOS.....	42
Extractos a concentración 50 µg/mL.....	42
Extractos a concentración 100 µg/mL.....	42
CAPÍTULO V: DISCUSIÓN.....	45
CAPÍTULO VI: CONCLUSIÓN.....	49
CAPÍTULO VII: RECOMENDACIONES.....	50
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51
ANEXOS.....	57



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Complicaciones bucales agudas y crónicas en los pacientes diabéticos.....	19
Tabla 2. Clasificación de los tipos de candidiasis bucal.....	28
Tabla 3. Características de los métodos empleados para la valoración de susceptibilidad antimicrobiana.....	34
Tabla 4. Especímenes biológicos empleados para la determinación de actividad antifúngica.....	38
Tabla 5. Características de los métodos empleados para la valoración de susceptibilidad antimicrobiana.....	43

www.bdigital.ula.ve

**ÍNDICE DE FIGURAS**

Figura 1. Planta de <i>Calendula officinalis</i>	9
Figura 2. Clasificación de la Diabetes Mellitus.....	16
Figura 3. Especímenes biológicos. a) Colección de cepas de <i>Candida albicans</i> . b) colección de cepas reactivadas. c) Extractos de <i>Calendula officinalis</i> L..	38
Figura 4. Prueba para la actividad antifúngica. a) Rotulación de las placas. b) Preparación de la solución stock del extracto. c) mezcla del extracto con el agar Sabouraud Dextrosa. d-e) Preparación del inóculo equivalente a 0,5 McFarland. f) Inoculación de las placas con la suspensión fúngica.....	41

www.bdigital.ula.ve

**ÍNDICE DE ANEXOS**

Anexo 1. Actividad antifúngica de los extractos a concentración 50 µg/mL respecto al tiempo de incubación.....	57
Anexo 2. Actividad antifúngica de los extractos a concentración 100 µg/mL respecto al tiempo de incubación.....	58
Anexo 3. Análisis fitoquímico de los extractos hexánico y etanólico.....	59
Anexo 4. Compuestos del extracto hexánico de flores <i>Calendula officinalis</i>	60
Anexo 5. Compuestos del extracto acetónico de flores <i>Calendula officinalis</i>	61

www.bdigital.ula.ve



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA
LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO E INVESTIGACIONES
MICROBIOLÓGICAS “PROF. CELINA ARAUJO DE PÉREZ”
MÉRIDA-VENEZUELA

Evaluación de la actividad antifúngica de Extractos de flores de *Calendula officinalis* L. sobre especies de *Candida albicans* aisladas de la cavidad bucal de pacientes diabéticos tipo 2

Autor: Br. María Alejandra Rangel Ávila.
Tutora: Prof. Elaysa J. Salas Osorio. PhD

RESUMEN

Introducción: La candidiasis bucal es una afección micótica ocasionada por el crecimiento y penetración de microorganismos fúngicos pertenecientes al género *Candida*; en los pacientes con Diabetes Mellitus tipo 2, la persistencia de diversos factores predisponentes, el desequilibrio metabólico y los microambientes anaeróbicos que crean el uso continuo de las prótesis junto con la disponibilidad de sustratos favorecen la colonización e infección por *Candida*, donde el uso de los antifúngicos traen consigo efectos colaterales debido a factores como baja potencia, baja solubilidad y toxicidad creando la necesidad de la búsqueda de nuevas opciones terapéuticas con menores efectos colaterales en los pacientes. **Objetivo:** evaluar *in vitro* la actividad antifúngica de los extractos obtenidos de flores de *Calendula officinalis* L. sobre una colección de 12 cepas de *Candida albicans* aisladas de lesiones bucales en pacientes diabéticos tipo 2. **Materiales y métodos:** se evaluó la actividad antifúngica de los extractos etanólico, acetónico y hexánico de flores de *Calendula officinalis* L. sobre una colección de 12 cepas de *Candida albicans* mediante la técnica de dilución en agar en medio agar Sabouraud dextrosa empleando dos concentraciones 50 µg/mL y 100 µg/mL. **Resultados:** no hubo variaciones significativas de acción antifúngica en las dos concentraciones evaluadas de los tres extractos, observándose un efecto fungistático a concentración 50 µg/mL y a 100 µg/mL un efecto fungicida. **Conclusiones:** los resultados obtenidos ofrecen resultados microbiológicos promisorios pudiendo ser sugerido como tratamiento alternativo coadyuvante o de primera línea para la candidiasis bucal.

PALABRAS CLAVES: *Calendula officinalis*, extractos, Diabetes Mellitus tipo 2, *Candida albicans*, actividad antifúngica.



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA
LABORATORIO DE DIAGNÓSTICO E INVESTIGACIONES
MICROBIOLÓGICAS “PROF. CELINA ARAUJO DE PÉREZ”
MÉRIDA-VENEZUELA

Evaluation of the antifungal activity of *Calendula officinalis* L. flower extracts on *Candida albicans* species isolated from the oral cavity of type 2 diabetic patients

Autor: Br. María Alejandra Rangel Ávila.
Tutora: Prof. Elaysa J. Salas Osorio. PhD

ABSTRACT

Introduction: Oral candidiasis is a fungal disease caused by the growth and penetration of fungal microorganisms belonging to the genus *Candida*, in patients with type 2 diabetes mellitus exists several predisposing factors, the metabolic imbalance and the anaerobic microenvironments that create the continuous use of the prostheses together with the availability of substrates favor colonization and *Candida* infection, where the use of antifungals produces side effects due to factors such as low potency, low solubility and toxicity, which creates the need to seek new therapeutic options with fewer side effects for the patients. **Objective:** to evaluate in vitro the antifungal activity of extracts obtained from flowers of *Calendula officinalis* L. in a collection of 12 strains of *Candida albicans* isolated from oral lesions in type 2 diabetic patients. **Materials and methods:** the antifungal activity of the extracts of ethanolic, acetonic and hexane of *Calendula officinalis* L flowers in a collection of 12 strains of *Candida albicans* using agar dilution technique with sabouraud dextrose agar using two concentrations 50 µg/mL and 100 µg/mL. **Results:** there were no significant variations of the antifungal action in the two evaluated concentrations of the three extracts, observing a fungistatic effect at 50 µg / mL of concentration and at 100 µg / mL fungicidal effect. **Conclusions:** the results obtained offer promising microbiological results and can be suggested as an alternative alternative treatment or first line treatment for oral candidiasis.

KEY WORDS: *Calendula officinalis*, extracts, Diabetes Mellitus type 2, *Candida albicans*, antifungal activity.



INTRODUCCIÓN

El uso de plantas para el tratamiento de enfermedades es ancestral y constituye una costumbre que se ha mantenido hasta nuestros días (Mesa *et al.*, 2004; Faria *et al.*, 2011; Soto & Sánchez, 2015); poblaciones milenarias como China y Egipto han recopilado registros de las diferentes utilidades que han tenido las plantas para el hombre, las cuales hoy día representan la fuente primaria empleada para la búsqueda de principios activos con actividad terapéutica y antimicrobiana (Mesa *et al.*, 2004; Faria *et al.*, 2011).

Desde el siglo XVI las descripciones de epidemias microbianas han demostrado que éstas han sido una importante causa de mortalidad para la cual no se contaba con tratamiento específico, no obstante, para el siglo XX en década de los 70 el auge de la era de los antibióticos y la aplicación de estos favoreció el aumento drástico de las infecciones por microorganismos fúngicos oportunistas (Vandeputte *et al.*, 2012).

Candida albicans como microorganismo fúngico oportunista, constituye una amenaza global importante, no solo por la amplia diseminación que tiene en pacientes con enfermedades de base, sino porque el hombre es su reservorio natural, encontrándose principalmente como microbiota habitual de la cavidad bucal (Rodríguez *et al.*, 2002; Añez *et al.*, 2009). En los pacientes diabéticos la hiperglucemia tiende a producir una reducción del flujo salival y de la respuesta vascular periférica favoreciendo a la acumulación de biopelícula dental, la formación de cálculo dental, desarrollo de caries, halitosis y enfermedad periodontal, así mismo la disponibilidad de carbohidratos favorece el crecimiento y colonización de *Candida albicans* lo que conlleva al desarrollo de candidiasis bucal (Ugalde, 2008; Negrato & Tarzia, 2010; Urbizo *et al.*, 2017).

Actualmente el empleo de antifúngicos por vía tópica y oral representan la opción terapéutica para el tratamiento de la candidiasis bucal, no obstante el uso indiscriminado y prolongado de estos ha traído consigo la aparición de



cepas resistentes conllevando a fallas terapéuticas que aunado a factores como baja potencia, baja solubilidad y toxicidad ameritan la búsqueda de terapias alternativas que sean efectivas y con menos efectos colaterales para los pacientes, acrecentando el uso de fitoterapéuticos como enjuagues y tinturas de *Calendula officinalis* como tratamiento empírico (Soto & Sánchez, 2015; Ojeda, 2016).

Por tal motivo, la determinación de la actividad biológica de tipo antifúngica de extractos resulta beneficioso, ya que permiten evaluar y determinar las concentraciones adecuadas así como de los principios activos con actividad antimicrobiana, a fin de servir como base científica para la elaboración de tratamiento coadyuvantes o de primera línea que permitan disminuir efectos colaterales y obtener resultados favorables para los pacientes diabéticos tipo 2 con candidiasis bucal.

www.bdigital.ula.ve



CAPITULO I EL PROBLEMA

1.1 Planteamiento del problema

La candidiasis bucal es una enfermedad infecciosa ocasionada por el crecimiento y penetración de microorganismos fúngicos pertenecientes al género *Candida* en los tejidos bucales, cuando las barreras físicas y las defensas del hospedero se encuentran alteradas, constituyendo la afectación micótica bucal más frecuente (Otero *et al.*, 2015). Dado que las levaduras del género *Candida* (principalmente *Candida albicans*) forman parte de la microbiota de la cavidad bucal, la presencia de este microorganismo junto con el estado de inmunosupresión de los pacientes juegan un rol fundamental en el desarrollo de esta patología infecciosa, cuya incidencia varía entre un 19% al 50% en los pacientes con cáncer, infecciones con VIH/Sida y Diabetes mellitus (De la Rosa, *et al.*, 2013; Otero *et al.*, 2015).

La Diabetes Mellitus (DM) constituye una enfermedad sistémica con alta prevalencia en adultos mayores, siendo la DM tipo 2 la más frecuente. El incremento paralelo de este grupo etario y la alteración del metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas propios de la enfermedad la han convertido en un problema de salud pública, cuyas repercusiones orgánicas no solo contribuyen al desmejoramiento de la calidad de vida del paciente sino que producen el desequilibrio de la microbiota bucal favoreciendo el crecimiento de *Candida albicans* (Rojas *et al.*, 2013, Cepero *et al.*, 2017).

La incidencia de candidiasis bucal en pacientes con Diabetes Mellitus ha sido reconocida por diversos autores cuyas investigaciones reflejan una clara relación entre la alteración de la salud bucal y la aparición de *Candida*, debido a que las condiciones fisiológicas de estos pacientes favorecen el desarrollo de *Candida* (Rojas *et al.*, 2013; Torrealba *et al.*, 2016). Estudios *in vitro* con células bucales de 50 pacientes diabéticos, demostraron un incremento significativo



en la adhesión de *Candida albicans*, respecto a 50 pacientes control no diabéticos divididos por edad, género y estado dental (Torrealba *et al.*, 2016).

Múltiples factores convergen en el paciente diabético que permiten justificar el desarrollo de candidiasis bucal tales como: el uso de prótesis dentales, hábitos tabáquicos, hiperglicemia, uso prolongado de esteroides o antibióticos de amplio espectro, fármacos inmunosupresores y con efectos xerostómicos que junto con la disfunción salival alteran la microbiota de la mucosa bucal contribuyendo a una mayor colonización y transporte de *C. albicans* en este grupo de pacientes, creando un entorno favorable para el desarrollo de candidiasis bucal (Jafari *et al.*, 2013; Patil *et al.*, 2015; Cepero *et al.*, 2017).

El tratamiento de la candidiasis bucal, incluye como primera línea de elección, una terapia tópica antifúngica para el tratamiento de candidiasis bucal inicial o recurrente y no complicada, empleándose principalmente los polienos y azoles. La terapia sistémica se encuentra reservada para los casos donde la terapia tópica no ha mostrado efectividad o para los casos más severos de candidiasis bucal, siendo el ketoconazol, fluconazol, anfotericina B, itraconazol los más usados (Otero *et al.*, 2015).

El uso de los antifúngicos se encuentra limitado debido a factores como baja potencia, baja solubilidad y toxicidad, por lo que constantemente se buscan nuevas opciones terapéuticas y preventivas que sean efectivas y con menos efectos colaterales para los pacientes, es así como, los productos elaborados a partir de extractos naturales obtenidos de plantas representan una buena alternativa dirigida a la disminución de microorganismos potencialmente patógenos en la mucosa bucal (Rodríguez, 2015); de allí que *Calendula officinalis* L. (*Asteraceae*) constituye una de estas opciones terapéuticas, ya que son ampliamente reconocidas las propiedades antiinflamatorias, antisépticas, antiespasmódicas y antimicrobianas a partir de preparados farmacéuticos (Gazim *et al.*, 2008).



El aceite esencial de *C. officinalis* L. ampliamente vendido como medicamento tópico, fue probado (usando la técnica de difusión de disco) contra microorganismos fúngicos tales como: *Candida krusei*, *Candida albicans* y *Candida glabrata*, mostrando una buena actividad antifúngica, constituyendo una opción terapéutica en el tratamiento de la candidiasis; así mismo, los estudios *in vivo* de enjuagues bucales con *C. officinalis* han demostrado la eficacia de esta planta en la reducción de la hemorragia gingival presentando también actividad antimicrobiana contra bacterias periodontopatógenas (Safdar *et al.*, 2010; Milián *et al.*, 2010; Arora *et al.*, 2013).

1.2 Formulación del problema

En Venezuela, el uso de extractos de plantas se realiza de manera empírica sin formulaciones. La determinación de concentraciones específicas de los extractos ya sea mínima fungicida o fungistática resultaría beneficioso, para la elaboración de tratamientos coadyuvantes o fármacos de primera línea para el tratamiento de Candidiasis bucal; por tal motivo, surge la siguiente interrogante ¿Presentan actividad antifúngica los extractos etanólico, acetónico y hexánico de flores de *Calendula officinalis* L. sobre especies de *Candida albicans* aisladas de la cavidad bucal de pacientes diabéticos tipo 2?

1.3. Justificación

La candidiasis bucal, es una enfermedad micótica cosmopolita y frecuente ocasionada por el crecimiento de levaduras del género *Candida*. Aunque la incidencia real se desconoce, se sabe que existe una alta prevalencia en el paciente diabético. Es considerada un problema de salud pública y se asocia con una alta tasa de morbilidad, incluso con la aplicación de tratamiento antifúngico de primera línea los pacientes tienden a presentar recaídas infecciosas.



Los efectos adversos de algunos antimicrobianos empleados en la terapia antifúngica han conllevado a la necesidad de buscar alternativas de prevención y tratamiento que sean efectivas, siendo los extractos de plantas la principal alternativa con resultados favorables en la disminución de los microorganismos en la mucosa bucal. Los estudios de diversas terapias antifúngicas naturales en pacientes diabéticos con candidiasis bucal son alentadores y promisorios.

En este sentido, la evaluación de la actividad antifúngica de extractos etanólico, acetónico hexánico de flores de *Calendula officinalis* representa una opción para el tratamiento antimicrobiano alternativo o coadyuvante contra especies de *Candida albicans* presentes en pacientes con DM tipo 2.

1.4 Objetivos

1.4.1.- Objetivo general

- Evaluar *in vitro* la actividad antifúngica de los extractos obtenidos de flores de *Calendula officinalis* L. sobre una colección de 11 cepas de *Candida albicans* aisladas de lesiones bucales en pacientes diabéticos tipo 2.

1.4.2.- Objetivos específicos.

- Determinar mediante la técnica de dilución en agar la actividad antifúngica del extracto etanólico de flores de *Calendula officinalis* sobre 11 cepas de *Candida albicans* aisladas de lesiones bucales en pacientes diabéticos tipo 2.

- Determinar mediante la técnica de dilución en agar la actividad antifúngica del extracto acetónico de flores de *Calendula officinalis* sobre 11 cepas de *Candida albicans* aisladas de lesiones bucales en pacientes diabéticos tipo 2.

- Determinar mediante la técnica de dilución en agar la actividad antifúngica del extracto hexánico de flores de *Calendula officinalis* sobre 11 cepas de *Candida albicans* aisladas de lesiones bucales en pacientes diabéticos tipo 2.



CAPÍTULO II MARCO TEÓRICO

2.1 *Calendula officinalis* L.

Es una planta cultivada desde el siglo XII por egipcios, hindúes y árabes y actualmente se ha extendido por todo el mundo (Palma, 2014). Sus nombres comunes son: Caléndula, Maravilla de jardín, flor de todos los meses, flor de difunto. La palabra Caléndula proviene del latín “*calendae*” es decir, primer día de cada mes del calendario. Su nombre históricamente ha sido asociado con su uso en sopas y guisos (Gazim *et al.*, 2008; Rodríguez, 2015).

Es nativa de Europa Central, Meridional, Asia Occidental y Estados Unidos, también se encuentra en las Islas Canarias y se ha adaptado a Brasil, empleada con fines medicinales en China, Estados Unidos, la India y otros países latinoamericanos (Muley *et al.*, 2009; Glehn & Rodríguez, 2012). Esta planta herbácea, anual rara vez bienal florece entre Mayo y Octubre, crece en todo tipo de suelos y en lugares soleados de toda América del Norte y Europa. Las flores de esta planta constituyen el órgano de mayor uso con fines ornamentales, medicinales, cosméticos y alimenticios (Muley *et al.*, 2009; Safdar *et al.*, 2010; Faria *et al.*, 2011; Palma, 2014).

2.1.1 Taxonomía de la planta

Taxonómicamente esta planta pertenece al Reino Plantae, Subreino Tracheobionta, División Magnoliophyta, Clase Magnoliopsida, Subclase Asteridae, Orden Asteroles, Familia *Asteraceae*, Tribu *Calenduleae*, Género *Calendula*, Especie *officinalis* (Muley *et al.*, 2009, NCBI, 2018).

2.1.2 Características

El género *Calendula* incluye aproximadamente 25 especies anuales o perennes siendo la más frecuente *Calendula officinalis* Linn., *Calendula*



arvensis Linn., *Calendula suffruticosa* Vahl., *Calendula stellata* Cav., *Calendula alata* Rech., *Calendula tripterocarpa* Rupr. (Arora *et al.*, 2013).

Calendula officinalis L. presenta un tallo erecto, angular, suave y ramificado desde la base superior, mide aproximadamente de 30 – 60 cm de altura, tiene una raíz de 20 cm de largo y numerosas raíces delgadas y secundarias. Las hojas inferiores son casi espatuladas en la base, oblongas o lanceoladas por encima, dentadas y carnosas, poseen un vástago angular, peludo y sólido. En la punta de cada tallo hay una cabeza de flor compuesta de 5 – 7 cm de diámetro que es grande en comparación con otra especie del género. El color de sus flores es de amarillo brillante a anaranjado (figura 1) (Muley *et al.*, 2009; Arora *et al.*, 2013; Palma, 2014).



Figura 1. Planta de *Calendula officinalis*.

Fuente: Palma, 2014.

2.1.3 Composición química

La importancia medicinal de *C. officinalis* se debe a la presencia de constituyentes químicos potencialmente activos, demostrados mediante una serie de estudios fitoquímicos. Las flores presentan entre sus compuestos: flavonoides, carotenoides, terpenos, aceites esenciales, taninos, cumarinas,



carbohidratos, ácidos grasos, mucilágenos, saponinas, resinas, ácido salicílico (Muley *et al.*, 2009; Safdar *et al.*, 2010; Palma, 2014; Rodríguez, 2015).

- Terpenos: son compuestos orgánicos aromáticos y volátiles constituidos por la unión de unidades de un hidrocarburo de 5 átomos de carbono, entre los que se incluyen sitosteroles, estigmasteroles, diesteres de dioles, eritrodiol, calendonadiol, 3-O-miristato, calendulosa G 6'-On- (principalmente en las raíces de plantas cultivadas y senescentes) y glucorónidos (principalmente en flores y partes verdes). A partir de los capítulos florales se han identificado 8 terpenos pentacíclicos faradiol-3-O-palmitato, faradiol-3-O-miristato, faradiol-3-O-laurato, arnidiol-3-O-palmitato, arnidiol-3-O-miristato, arnidiol-3-O-laurato, calenduladiol-3-O-palmitato y calenduladiol-3-O-miristato, además de tripterenos alcohólicos. Estos compuestos son metabolitos secundarios que le otorgan a las plantas las características organolépticas (aroma y sabor) favoreciendo la inhibición de la depredación repeliendo los insectos y los animales herbívoros, e incluso pueden actuar en algunos casos como insecticida; los terpenos constituyen la mayor parte del aceite esencial producido por las plantas aromáticas (Muley *et al.*, 2009; Palma, 2014).

- Flavonoides: son compuestos fenólicos que se encuentran en la planta, semilla y frutos, su función es proteger a la planta de los daños que la luz ultravioleta produce en algunos frutos durante la madurez. A partir del extracto etanólico de la inflorescencia de *C. officinalis*, se han identificado aproximadamente 22 tipos de flavonoides, siendo los más investigados: quercetina, isoramnetina, isoquercetina, glucósidos de isoramnetina, narcisina, calendoflávico, calendoflavósido, kaempferol, rutinósido y rutósido (Muley *et al.*, 2009; Palma, 2014).

- Carotenoides: presente en las flores como provitamina A, estos compuestos proporcionan diferentes colores a las flores y frutos, que le permiten atraer animales e insectos a la planta. El contenido de carotenoides en las flores puede variar de 0.0048 a 2,47 mg. Se han reportado al menos 19 tipos, los



cuales están conformados por dos grupos que se diferencian en su composición de 5-cis carotenoides y cis-to trans (Palma, 2014; Rodríguez, 2015).

- Cumarinas: el extracto de etanol de la inflorescencia de *C. officinalis* demostró que contienen cumarinas, escopoletina, umbeliferona y esculetina. Este compuesto se encuentra en los tegumentos de las semillas, frutos, flores, raíces, hojas y tallos, con mayor concentración en frutos y flores, actúa como defensor de la planta, ya que al otorgarle un sabor amargo evita la palatabilidad por parte de animales de pastoreo (Muley *et al.*, 2009).

- Quinonas: encontradas en el cloroplasto como plastoquinona, filoquinona, α -tocoferol, ubiquinona, filoquinona, α -tocoferol en las mitocondrias y filoquinona en las hojas (Muley *et al.*, 2009).

- Aceites esenciales: comprenden las sustancias líquidas aromáticas y volátiles, poseen una química compleja, producto de una mezcla de un grupo heterogéneo de sustancias orgánicas, hidrocarburos, alcoholes, aldehídos, cetonas y éteres. Los rendimientos van de 0.03 y 0.09 % en hojas y flores de *Calendula*, con alrededor de 30 tipos pertenecientes a los sesquiterpenoides y monoterpenos (Palma, 2014; Rodríguez, 2015).

Las flores de *Calendula* contienen el máximo de aceite volátil en plena floración (0.97%) y mínimo durante la fase de pre-florestación (0.13%). El aceite esencial es rico en α -cadinero, 1,8 cineol con p-cimero en niveles más bajos en los períodos posteriores a la floración y α -tujeno y ζ -cadineno. En este sentido también se ha descrito que *C. officinalis* tiene potencial como oleaginosa, ya que su semilla puede contener de 15 a 20% de aceite, donde el ácido caléndico es el componente mayoritario (Muley *et al.*, 2009; Palma, 2014).

- Otros compuestos: entre los que se encuentran lípidos, carbohidratos y ácidos grasos como ácido laúrico, mirístico, palmítico, además de loliolide (calendín) calendulina y n-parafinas (Muley *et al.*, 2009).



2.1.4 Usos de la planta

Históricamente el uso de la *Calendula* se ha asociado con sopas y guisos, para combatir enfermedades, de igual manera se destaca su amplia utilización en cosméticos, perfumes, preparaciones farmacéuticas y alimentos (Gazim *et al.*, 2008).

- Uso medicinal: *Calendula* contiene diversos compuestos químicos, los cuales han sido obtenidos a partir de sus hojas y flores. La preparación de extractos empleando las flores han sido utilizado como tinturas, bálsamos y ungüentos para favorecer la regeneración de tejidos; también se le han descrito efectos antipiréticos, antisépticos y cicatrizantes (Molina *et al.*, 2008; Muley *et al.*, 2009; Arora *et al.*, 2013). En Italia el té de las flores es utilizado en gárgaras, colirios o compresas para tratar conjuntivitis y faringitis. Hoy día los pétalos secos de la *Caléndula* son usados para reducir la inflamación (Safdar *et al.*, 2010).

Por su parte, las hojas se consideran disolvente, diaforético y diurético y la tintura madre de *C. officinalis* se utiliza en la homeopatía para el tratamiento de la tensión mental y el insomnio (Arora *et al.*, 2013).

- Cosmético: para el cuidado de la piel y en personas con acné (Palma, 2014).

- Industrial: las flores de *Calendula* son de color naranja, debido a su alto contenido de carotenoides empleado en la industria alimenticia como colorante. Presenta potencial como oleaginosa, su semilla puede contener de 15 a 20 % de aceite, dicho aceite tiene aplicaciones industriales debido a su oxidación rápida y como posible sustituto del árbol de Tung, siendo usado para acelerar el secado de pinturas, recubrimiento y adhesivos (Palma, 2014; Schimiderer *et al.*, 2015).

- Área Microbiológica: los aceites esenciales son ampliamente vendidos como medicamentos tópicos y han sido aprobados (usando la técnica de difusión de disco) contra diversas cepas de hongos levaduriformes, tales como: *Candida krusei*, *Candida albicans* y *Candida glabrata*, mostrando una buena actividad antifúngica aplicándose en el tratamiento de la candidiasis. También, se ha



demostrado actividad antibacteriana inhibiendo bacterias como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* (Muley *et al.*, 2009; Safdar *et al.*, 2010; Milián *et al.*, 2010; Palma, 2014).

- Área Odontológica: ha sido indicada como coadyuvante en el tratamiento postquirúrgico, herpes labial, gingivitis y úlceras bucales. También se usa como enjuague bucal por sus propiedades antiinflamatorias ya sea, durante la inflamación e irritación de las encías, en inflamaciones de la mucosa bucal y faríngea, en heridas y quemaduras debido a que sus propiedades antibacterianas controlan el crecimiento de microorganismos periodontopatógenos (Molina *et al.*, 2008; Sudhakar *et al.*, 2013; Arora *et al.*, 2013).

2.2 Diabetes Mellitus

2.2.1 Generalidades

La DM es una enfermedad sistémica, crónico-degenerativa, resultado de una predisposición genética en combinación con factores medioambientales, cuya prevalencia mundial es producto del envejecimiento de la población y de factores conductuales asociados a la urbanización de las poblaciones (American Diabetes Association, 2014; Chen *et al* 2012). Este síndrome comprende trastornos del metabolismo de los carbohidratos, proteínas y lípidos, con hiperglucemia, ya sea por deficiencia absoluta de la secreción de insulina, reducción en la eficacia biológica de dicha hormona o por ambos (Chen *et al* 2012).

La hiperglucemia sostenida en el tiempo se asocia con daños y disfunción de varios órganos y sistemas, entre los que se encuentran: riñones, ojos, nervios, corazón y vasos sanguíneos. Los principales síntomas de la hiperglucemia son la poliuria, polidipsia, neuropatía, aterosclerosis y microangiopatía renal y ocular. Esta enfermedad sistémica puede controlarse mediante dieta y medicamentos hipoglucémicos orales, no existen medicamentos que curen esta patología metabólica (Ugalde, 2008; Estrada *et al.*, 2015; Torrealba *et al.*, 2016).



La DM es un problema creciente de salud pública, frecuente en todo el mundo que afecta a todos los grupos etarios principalmente a los adultos, individuos con edades superiores a los 45 años y personas obesas. Esta enfermedad crónico-degenerativa tiene grados variables de predisposición hereditaria, ya que en su desarrollo participan diferentes combinaciones de genes junto con factores ambientales y estilos de vidas. En este sentido, la hiperglucemia es un marcador de severidad del estado metabólico subyacente más que la naturaleza del proceso en sí mismo y muchas veces el odontólogo puede detectarla por ciertas manifestaciones bucales, que aunque no son patognomónicas de la diabetes, su localización y características les permite sospecharlas y solicitar análisis de rutina (Ugalde, 2008; Sanz & Bascones, 2009; Sánchez *et al.*, 2017).

Aunque todas las formas de diabetes producen hiperglucemia como manifestación común, los procesos patogénicos implicados en la hiperglucemia varían ampliamente y la clasificación actual refleja el gran conocimiento de la patogénesis de cada variante (Sanz & Bascones, 2009).

2.2.2 Clasificación de la Diabetes

La Asociación Americana de Diabetes (ADA) la clasifica de la siguiente forma: diabetes tipo1 (DMT1), diabetes tipo 2 (DMT2), diabetes gestacional y otros tipos de diabetes frecuentes como: la diabetes autoinmune latente del adulto, diabetes producida por otras enfermedades (hipertiroidismo, síndrome o enfermedad de Cushing, acromegalia, trastornos endocrinos múltiples, entre otras) por medicamentos (cortisona y sus derivados) o agentes tóxicos (figura 2) (American Diabetes Association, 2014; Urbizo *et al.* 2017).

- Diabetes mellitus tipo 1 o insulino dependientes, muy frecuente en niños, comienza a manifestarse en la pubertad y progresa con la edad. El inicio de este tipo de diabetes es brusco debido a una carencia grave de insulina causada por la destrucción inmunológica de células β del páncreas muchos



años antes de que la enfermedad se manifieste. La hiperglucemia y la cetoacidosis constituyen las manifestaciones clásicas de la enfermedad que aparecen en los estadios avanzados de su evolución, cuando la destrucción inmunológica afecta a más del 90% de las células β (Sanz & Bascones, 2009; Rojas *et al.*, 2013).

- Diabetes mellitus tipo 2 o no insulino dependiente es la más frecuente (Al-Maskari *et al.*, 2011), predomina la incapacidad para incorporar glucosa a las células musculares y al tejido adiposo (resistencia a la insulina) aunado a una relativa deficiencia de la secreción o acción de la insulina. Constituye aproximadamente el 80-90% de los casos de diabetes y los factores ambientales como un estilo de vida sedentario y una dieta alimenticia inadecuada desempeñan un papel importante, ya que su patogenia sigue siendo enigmática (Ugalde, 2008; Sanz & Bascones, 2009).

- Otros tipos específicos de diabetes relacionada con efectos genéticos que alteran la función de las células β del páncreas, los receptores para insulina, la acción de la misma y la influencia con otras hormonas, así como los efectos de ciertos fármacos que afectan la acción o secreción de la insulina (figura 2) (Ugalde, 2008, American Diabetes Association, 2014).

- Diabetes gestacional representada por intolerancia a la glucosa debido a cambios metabólicos de origen hormonal durante el embarazo (Ugalde, 2008; American Diabetes Association, 2014).

La Asociación Americana de Diabetes reconoce también un grupo intermedio de sujetos, que aunque no cumplen criterios de diabetes, poseen niveles de glucosa elevados para ser considerados normales, se conoce con el nombre de “prediabetes”, debido al alto riesgo de desarrollo de la enfermedad en este grupo de pacientes. Es importante acotar que no son entidades clínicas por sí mismas, sino factores de riesgo para una diabetes futura y para enfermedades cardiovasculares (Sanz & Bascones, 2009).

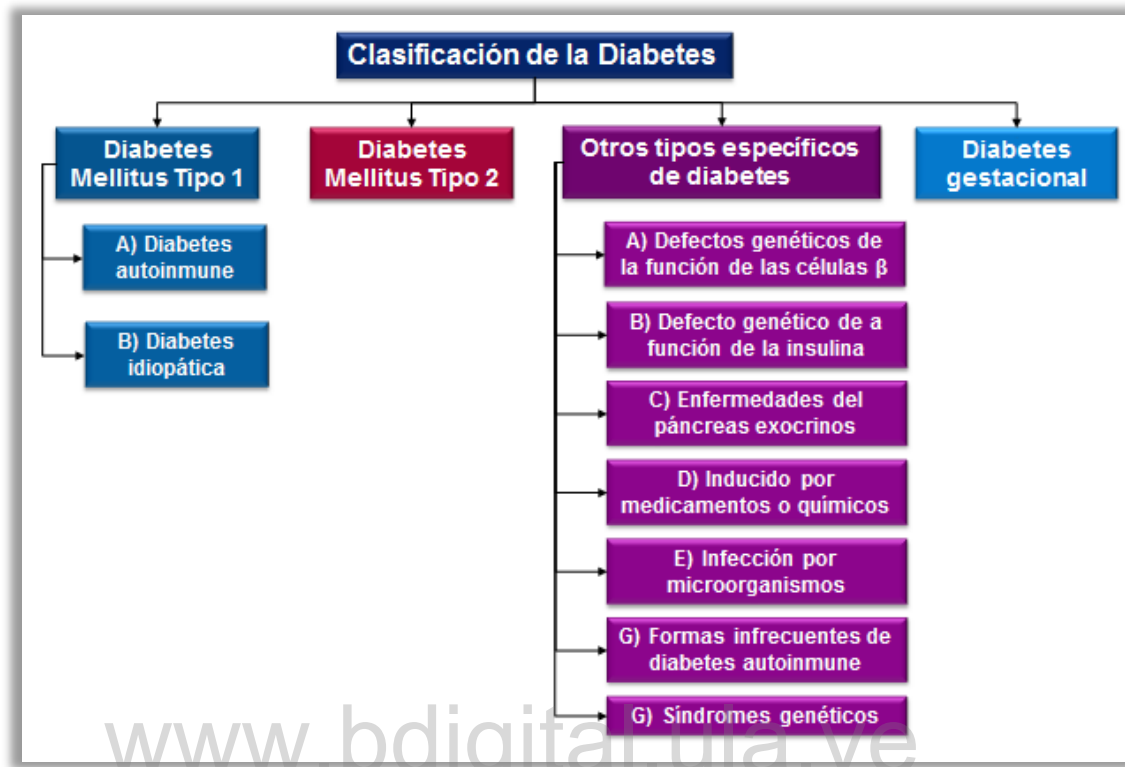


Figura 2. Clasificación de la Diabetes Mellitus

Fuente: Elaborado por el autor.

2.2.3.- Epidemiología

La DM es un problema creciente de salud pública. Las proyecciones que la Organización Mundial de la Salud (OMS) para el inicio del siglo XXI indican que el 2,1% de la población mundial, aproximadamente unos 125 millones de personas, el 4% corresponderá a DM tipo 1 y el 96% a DM tipo 2 (Ugalde, 2008; Al-Maskari *et al.*, 2011). Para el 2012, la Federación Internacional de Diabetes (FID) indicó que más de 371 millones de personas vivían con dicha enfermedad y que 4,8 millones de personas mueren a causa de la misma (Linares *et al.*, 2017).



Actualmente la DM se considera una pandemia con tendencia ascendente, tanto para los países desarrollados como para los países limitados de recursos (Ugalde, 2008; Linares *et al.*, 2017).

En EE.UU, se calcula que la diabetes afecta a 16 millones de personas, de los cuales aproximadamente la mitad no están diagnosticados. Cada año unos 800.000 individuos desarrollan diabetes en este país y 54.000 fallecen por causas relacionadas con la diabetes. Por otro lado, se ha observado que el riesgo de padecer este desorden metabólico es mayor en la población afroamericana, hispana y en comunidades nativas americanas, en comparación con los blancos no hispanos. A nivel mundial, más de 140 millones de personas padecen diabetes, lo que la convierte en una de las causas más frecuentes de enfermedades no declarables (Sanz & Bascones, 2009).

Existen por lo menos 30 millones de diabéticos en el mundo, de los cuales cerca de 13 millones se encuentran en Latinoamérica y el Caribe. Se estima que aproximadamente 6% de la población venezolana la padece, es decir entre 1.200.000 y 1.500.000 venezolanos son diabéticos, y en el caso particular del Estado Mérida según la Corporación Regional de Salud, existen aproximadamente 13.687 personas diabéticas (Torrealba *et al.*, 2016). En este sentido, existe una relación estrecha entre las enfermedades de la cavidad bucal y el control de enfermedades sistémicas (microvasculares y macrovasculares) en las que la DM, en los últimos años, ha mostrado un incremento de su prevalencia y ha alcanzado dimensiones epidémicas ocupando la 7ª causa de muerte del siglo XXI (Sánchez *et al.*, 2017).

2.2.4 Principales manifestaciones infecciosas en cavidad bucal en diabéticos

El deterioro del sistema inmunitario de los pacientes diabéticos y los cambios suscitados en la ecología de la cavidad bucal producto de la



alteración sistémica conlleva a una susceptibilidad incrementada de infecciones bucales; por lo tanto, las personas con DM son más propensas a desarrollar infecciones en la cavidad bucal debido al descontrol glucémico, donde el desarrollo de enfermedades inflamatorias y patologías de tejidos blandos son muy frecuentes (Negrato & Tarzia, 2010; Al-Maskari *et al.*, 2011; Rojas *et al.*, 2013).

La Hiperglucemia de larga duración afecta la función de las glándulas salivales lo que conduce a una reducción del flujo salival y a una disminución de la respuesta vascular periférica favoreciendo a la acumulación de biopelícula dental, la formación de cálculo dental, desarrollo de caries, halitosis y enfermedad periodontal. La mayoría de las manifestaciones bucales descritas en la literatura tanto para diabetes tipo 1 como para la diabetes tipo 2, son vistas en pacientes diabéticos no controlados, es así, como diversos estudios han demostrado que cuando la hiperglucemia está controlada apropiadamente las manifestaciones bucales son mínimas y en algunos pacientes son inexistentes (Ugalde, 2008; Negrato & Tarzia, 2010; Fernández *et al.*, 2013; Urbizo *et al.*, 2017).

En los pacientes diabéticos los niveles de glucosa aumentan o disminuyen bruscamente, predisponiendo a estos pacientes a diversas complicaciones tanto agudas como crónicas (tabla 1) (Sanz & Bascones, 2009).

**Tabla 1. Complicaciones bucales agudas y crónicas en los pacientes diabéticos**

Complicaciones agudas	Complicaciones crónicas
<ul style="list-style-type: none">- Concentración aumentada de mucina y glucosa.- Deterioro de la producción y/o acción de muchos factores antimicrobianos.- La ausencia de glucosa, que contiene Zn (Zinc) y es el responsable de la maduración constante de las papilas gustativas.- Disgeusia.- Candidiasis oral.- Aumento en la exfoliación celular después del contacto, debido a la mala lubricación.- Aumento de la proliferación de microorganismos patógenos- Lengua saburral.- Halitosis	<ul style="list-style-type: none">- Alteraciones de la lengua, generalmente boca ardiente, lengua geográfica, lengua fisurada.- Enfermedad periodontal (periodontitis y gingivitis).- Manchas blancas debido a la desmineralización en los dientes.- Caries.- Retraso en la cicatrización de las heridas.- Mayor tendencia a las infecciones micóticas, bacterianas y virales.- Liquen plano.- Ulceraciones de la mucosa.

Fuente: Negrato & Tarzia, 2010; Sanz & Bascones, 2009

La identificación y/o tratamiento oportuno de estas manifestaciones bucales pueden ayudar en el diagnóstico precoz de la diabetes y mejorar el de la glucemia otorgándoles una mejor calidad de vida a los pacientes con DM (Sanz & Bascones, 2009).

2.3 Candidiasis

2.3.1 Generalidades

En la cavidad bucal se encuentran un número infinito de bacterias y otros organismos de vida saprófita y con ellas las distintas especies de *Candida* pero sin desarrollar alteración patológica, de modo que tienen que converger determinados elementos que rompan el equilibrio que existe entre los



microorganismos fúngicos y el ambiente bucal favoreciendo la proliferación micótica (Rodríguez *et al.*, 2002).

Recientemente ha aumentado el interés con respecto a las infecciones producidas por los hongos del género *Candida*, esto ha traído como resultado que se hayan realizado una gran cantidad de investigaciones. *Candida* spp. forma parte de la microbiota habitual de la cavidad bucal, tracto gastrointestinal, tracto respiratorio, vagina y piel, donde reside con mayor frecuencia entre los pliegues naturales que son sitios relativamente calientes y húmedos, son agentes infecciosos endógenos específicos; pueden ser transmisibles pero sólo producen infección de la mucosa en presencia de una predisposición local o general, de ahí que sean considerados hongos oportunistas. *Candida albicans* constituye el principal agente involucrado en la Candidiasis, una enfermedad infecciosa micótica causada por especies de *Candida* (Pardi & Cardozo, 2002; Rodríguez *et al.*, 2002; Añez *et al.*, 2009).

La Candidiasis bucal afecta a ambos géneros y en cualquier edad, aunque siendo más frecuente en los extremos de la vida. La magnitud de la infección micótica dependerá fundamentalmente de las condiciones del hospedero, pues el establecimiento de la micosis ocurre cuando se perturban los parámetros del equilibrio fisiológico que mantienen la homeostasia del medio bucal. Microbiológicamente como agente etiológico de la infección micótica *Candida albicans* constituye la especie más prevalente, sin embargo en la cavidad bucal han sido aisladas otras especies como *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* y *Candida parapsilosis* (Añez *et al.*, 2009; Rodríguez *et al.*, 2002).

Esta micosis no es una enfermedad mortal, sin embargo, provoca disgeusia haciendo desagradable y dolorosa la ingesta de los alimentos, lo que conlleva a una disminución del apetito. En la mayoría de los pacientes, la candidiasis bucal se produce a partir de un reservorio endógeno (bucal o digestivo). Es común en individuos con inmunodeficiencias, en algunos casos la infección



también se puede adquirir de otras personas, como puede ocurrir en la candidiasis neonatal donde las madres presentan candidiasis vulvovaginal al momento del parto (Rodríguez *et al.*, 2002; Aguirre, 2002; Mayer *et al.*, 2013; Da Silva *et al.*, 2014).

Todas aquellas circunstancias que alteren la integridad de la mucosa mediante traumatismos, maceración u oclusión (como ocurre en los portadores de prótesis dental) favorecen la adhesión del hongo y la invasión de éste hacia la mucosa. Aunque la relación entre candidiasis bucal y diabetes es conocida desde la antigüedad, los trabajos comparativos no han demostrado de forma concluyente mayor colonización por *Candida* en los pacientes diabéticos; tampoco se ha demostrado una relación entre el control glucémico o el tipo de tratamiento diabético y la densidad de levaduras en la cavidad oral. Sin embargo, si se ha constatado una prevalencia de *Candida* en la boca de los diabéticos portadores de prótesis dentales con respecto a los no portadores, haciendo posible que la asociación de diversos factores predisponentes en estos pacientes facilite más rápidamente la colonización e infección por *Candida* (Aguirre, 2002).

2.3.2 Epidemiología de la candidiasis

Históricamente la candidiasis ha afectado a las personas desde el año 2.000 A.C, como infecciones superficiales de la mucosa bucal y vaginal. Sin embargo, no fue hasta los años 1.800 que se investigó la patogenia de esta enfermedad micótica. Los estudios epidemiológicos realizados en los últimos años, han mostrado una variación considerable en la prevalencia de las lesiones de la mucosa bucal en diferentes lugares del mundo (Rioboo *et al.*, 2004; Patil *et al.*, 2015).

La presencia de *Candida* en la población general, ha sido demostrada en diversos grupos etáricos entre los que se encuentran recién nacidos, lactantes,



niños, adultos, siendo de mayor proporción la tercera edad (Rodríguez *et al.*, 2002; Rioboo *et al.*, 2004).

La prevalencia de especies de *Candida* en la cavidad bucal es un hallazgo muy habitual (7 a 65%); sin embargo, muy pocos portadores sufren infecciones por *Candida*. Además, los contajes de *Candida* en portadores sanos son inferiores a los contajes hallados en personas que padecen distintas formas de candidiasis, su valor aproximado es de 300-800 UFC/mL en saliva frente a recuentos superiores a 20.000 UFC/mL respectivamente. Estos datos tienen un valor limitado, debido a que personas sanas pueden tolerar altos contajes de *Candida* sin padecer la enfermedad, mientras que recuentos bajos pueden favorecerla en personas debilitadas (Otero *et al.*, 2015).

La incidencia de *Candida albicans* en la cavidad bucal ha sido del 45 % en recién nacidos, de 45% al 65% en niños sanos, de 30% a 45% en adultos sanos y 50-65% en personas con prótesis dentales. Sin embargo, la candidiasis, dependiendo del estado inmunitario del hospedero y de la localización de las manifestaciones clínicas, puede ser superficial o profunda. Al ser constituida como un proceso frecuente, se considera en la candidiasis bucal que más de 4/1000 pacientes de una consulta general presenta signos de infección. No obstante, dado que la parte de los casos cursan sin sintomatología aparente, la prevalencia debe ser mayor (Akpan & Morgan, 2002; Pardi & Cardozo, 2002; Otero *et al.*, 2015).

La candidiasis bucal fue la primera forma clínica descrita dentro de esta entidad infecciosa. Actualmente, su incidencia está en aumento en los países desarrollados debido a factores facilitadores como la generalización del uso de prótesis dentales, la xerostomía, las múltiples terapias con antibióticos, tratamientos inmunosupresores, antineoplásicos, diabetes, prediabetes, tabaco entre otros (Aguirre, 2002).



2.3.3 Factores bucales que predisponen al padecimiento de candidiasis en los pacientes diabéticos

2.3.3.1 Factores locales

- Alteración de la barrera mucosa:

- Pérdida de continuidad o integridad de la mucosa: mediante traumatismos, maceración u oclusión (como ocurre en los portadores de prótesis dental) favorecen la adhesión del hongo y la invasión de la mucosa (Aguirre, 2002; Otero *et al.*, 2015).

- Modificaciones en el espesor de la mucosa: a medida que el epitelio se atrofia, un elemento más del envejecimiento, facilita la penetración de *C. albicans* la cual es capaz de inducir cambios, que incrementan la actividad mitótica (Aguirre, 2002).

- Alteraciones salivales:

- Reducción en el pH salival: habitualmente el pH oscila entre 5,6 y 7,8 como ocurre bajo las prótesis dentales removibles favoreciendo la adhesión de *Candida spp.* a la mucosa.

-Reducción de la saliva: tanto en cantidad como en calidad debido fármacos hipotensores (Aguirre, 2002).

- Dieta rica en hidratos de carbono: las concentraciones altas de glucosa aumentan receptores de *C. albicans*, incrementando su resistencia a la fagocitosis (Otero *et al.*, 2015).

- Tabaco: el hábito de fumar favorece la aparición de lesiones y microabrasiones en la mucosa que facilitan la colonización, se ha descrito que algunas especies de *Candida* pueden convertir los hidrocarburos aromáticos del humo en metabolitos carcinogénicos (Otero *et al.*, 2015).

- Otros: leucoplasia, cáncer bucal, prótesis (estomatitis protética) (Rodríguez *et al.*, 2002).



2.3.3.2 Factores sistémicos

- Edad (períodos extremos de la vida): en los ancianos una enfermedad frecuente es la palatitis candidiásica crónica y la queilitis angular, con una prevalencia de 38% y 26% respectivamente. Sin embargo, la tercera edad no debe considerarse un factor predisponente, sin embargo son los pacientes más vulnerables y con más patologías sistémicas (Otero *et al.*, 2015).
- Alteraciones endocrinas: la DM es la más relacionada, ya que la elevada concentración y disponibilidad de glucosa favorece la adhesión del hongo (Aguirre, 2002).
- Alteraciones nutricionales: las enfermedades anémicas favorecen la aparición de anomalías en el epitelio y alteran algunos procesos inmunológicos, destacando también la avitaminosis con deficiencia de folato, B1, B2, B12 (Aguirre, 2002).
- Enfermedades sistémicas: la candidiasis mucocutánea crónica, candidiasis atrófica crónica, glositis atrófica y queilitis angular. En ciertas enfermedades malignas y en pacientes con síndromes mieloproliferativos también es mayor la prevalencia (Rodríguez *et al.*, 2002).

2.3.3.3.- Factores iatrogénicos

- Tratamiento con antibióticos: la utilización de antibióticos de amplio espectro afecta negativamente la microbiota, alterando su equilibrio (Rodríguez *et al.*, 2002).
- Tratamiento con corticoides: los corticosteroides de forma sistémica favorecen el crecimiento de *C. albicans*, sin embargo, el efecto de los corticoides debería añadirse el papel de la enfermedad de base para la cual se administran (Otero *et al.*, 2015).

2.3.4 Especies de *Candida* asociadas a manifestaciones bucales

Las infecciones bucales causadas por levaduras del género *Candida* han sido reconocidas a lo largo de la historia. *Candida* spp. pertenece a la



microbiota habitual de la cavidad bucal de individuos sanos, no obstante estas levaduras pueden causar infecciones bucales y/o de la orofaringe (Williams & Lewis, 2011; Da Silva *et al.*, 2014).

Los microorganismos involucrados como agentes etiológicos de la candidiasis, se encuentran clasificados taxonómicamente en el Reino: Fungi División: *Ascomycota* Clase: *Saccharomycetes* Familia: *Debaryomycetaceae* Género: *Candida* (NCBI, 2018). Este género comprende más de 150 especies, cuya principal característica es la ausencia de forma sexual con excepción de algunas especies micóticas. Son clasificadas como levaduras, las cuales corresponden a hongos con un modo de desarrollo predominantemente unicelular. Solamente una docena de las especies pertenecientes al género *Candida* poseen la facultad de adaptarse a una temperatura de 37°C y pueden ser ocasionalmente patógenas para el hombre, dentro de ellas están: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. kefyr*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* (Pardi & Cardozo, 2002; NCBI, 2018).

La Literatura actual demuestra que entre el 80-90% de la microbiota fúngica se encuentra constituida por *C. albicans* y el resto es atribuido a otras especies, siendo las más comunes *C. glabrata* (9-15%) y *C. tropicalis* (15% de los casos). Sin embargo, otras especies de *Candida* tales como *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. dubliniensis* y *C. tropicalis* también han sido aisladas en saliva de pacientes con o sin candidiasis bucal y siendo *C. albicans* la especie de mayor frecuencia asociada con lesiones bucales (Glen & Rodríguez, 2012; Da Silva *et al.*, 2014).

2.3.4.1 *Candida albicans*

C. albicans es una célula eucariota, oval, levaduriforme de 2 a 4 micras, presenta una pared celular delgada, en los tejidos infectados se ha identificado en forma filamentosa denominadas hifas y pseudohifas que son células alargadas de levadura que permanecen unidas entre sí. Microscópicamente



C. albicans presenta dimorfismo (capacidad de formar pseudohifas, hifas y pseudomicelio), también puede formar esporas grandes de pared gruesa, denominadas clamidosporas las cuales se evidencian mediante el cultivo en bilis agar durante 48 horas a temperatura ambiente y la formación de tubos germinales los cuales son producidos por *C. albicans* y *C. dubliniensis* al colocar un pequeño inóculo de la levadura en suero humano, de conejo o ratón, clara de huevo o en solución protéica, durante un lapso de 2-4 h a 37 °C (Mendoza, 2005). La pared celular de *C. albicans* está compuesta principalmente por polisacáridos (el Manano o Manoproteína que ocupa más del 40% y principal antígeno de la superficie celular), proteínas entre un 6% y 25%, lípidos entre 1% y 7% y quitina entre 0,6% y 9% del peso de la pared celular (Pardi & Cardozo, 2002).

Una etapa esencial en el desarrollo de la candidiasis bucal es la colonización de ésta por parte de *C. albicans*, proceso que involucra la adquisición, adherencia y mantenimiento de una población estable de levaduras. La infección por este microorganismo produce malestar, disgeusia, disfagia, recuperación lenta y una hospitalización permanente, donde la infección puede propagarse a través del torrente sanguíneo o tracto gastrointestinal pudiendo producir una infección grave y diseminada con una morbi-mortalidad significativa (Apkan & Morgan, 2002; Pardi & Cardozo, 2002).

Existen diversas circunstancias que provocan variaciones sobre la colonización bucal por *C. albicans* como lo son: la hospitalización, tratamiento antimicrobiano prolongado, la alimentación, la edad, alteraciones salivales, el uso de prótesis dentales, el tabaco, alteraciones inmunológicas y endocrinas (diabetes), incluso se ha podido comprobar que existen variaciones del estado del portador a lo largo del día y una especial afinidad por colonizar el dorso lingual, el paladar y la mucosa bucal, por lo tanto el establecimiento de la candidiasis ocurre cuando se perturban los parámetros de equilibrio fisiológico



que mantienen la homeostasia del medio bucal (Aguirre, 2002; Rodríguez *et al.*, 2002; Otero *et al.*, 2015).

2.3.5.- Clasificación de la candidiasis bucal

Una característica común en todas las clasificaciones de la candidiasis bucal ha sido la tendencia a diferenciar claramente las formas agudas, de corta evolución y que remiten con el tratamiento, de las formas crónicas, de larga evolución y generalmente de difícil tratamiento, probablemente por la persistencia de factores predisponentes. Actualmente consideramos las siguientes formas clínicas de candidiasis oral (ver tabla 2) (Otero *et al.*, 2015).

www.bdigital.ula.ve



Tabla 2. Clasificación de los tipos de candidiasis bucal

Tipo de Candidiasis	Características clínicas	Localización	Presentación clínica		Diagnóstico	Referencia
			Signos	Síntomas		
Candidiasis pseudomembranosa	Llamada también "muguet". -Forma aguda: evolución menor de 15 días. -Forma crónica: persiste en el tiempo	-Mucosa bucal: yugal, paladar, orofaringe, márgenes laterales de la lengua y encías	Placas blanquecinas o amarillentas, blandas o cremosas.	-Hipogeusia -Disgeusia. -Ardor. -Dolor.	-Examen clínico. -Recolección de la muestra mediante raspado. -Visualización de hifas, pseudohifas y levaduras	Aguirre, 2002; Al-Maskari <i>et al.</i> , 2011; Otero <i>et al.</i> , 2015.
Candidiasis eritematosa	Llamada también "Lengua dolorosa antibiótica". -Forma aguda: parte de la lengua -Forma crónica: afecta el paladar	-Mucosa oral: dorso lingual y paladar	-Depapilación de la mucosa (pérdida de las papilas filiformes) -Eritema de diversos tamaños.	-Imposibilidad de ingerir alimentos (ácidos, picantes o calientes). -Dolor profundo. -Resequedad.	-Examen clínico. -Raspado para cultivo de la mucosa de la lengua.	Ugalde, 2008; Otero <i>et al.</i> , 2015
Candidiasis hiperplásica	Llamada también "Leucoplasia candidiásica". -Forma homogénea: placa blanca uniforme y adherente -Forma nodular: con presencia de nódulos múltiples	-Mucosa yugales: zona retrocomisural -Lengua, labios y paladar	-Placas blancas que no desprenden con raspado -Lesiones bilaterales, retrocomisurales con forma triangular de base anterior y vértice posterior.	-Son indoloras.	-Biopsia para diferenciarla de otros procesos cancerígenos	Williams & Lewis, 2011; Otero <i>et al.</i> , 2015
Candidiasis mucocutánea	"Síndrome crónico de candidiasis mucocutánea", se presenta ocupando extensas áreas de piel, mucosa oral y uñas. - No es hereditaria	- Ocupa extensas áreas de piel, mucosa oral y uñas. - Costras densas	-Engrosamiento, cambio de color y agrietamiento de la uña -Erupción originando deformación, puede cubrir la cara y el cuero cabelludo		-Examen clínico	Otero <i>et al.</i> , 2015
Lesiones asociadas a Candidiasis						
Estomatitis Protésica	"Estomatitis subprótesis o Palatitis subplaca"	-Mucosa palatina con mayor frecuencia. -Mucosa mandibular.	Eritema y edema que afecta parte o totalidad de la mucosa palatina	-Asintomático -Bajos episodios dolorosos -Quemazón y picor	-Examen clínico y microbiológico.	Rodríguez <i>et al.</i> , 2002; Otero <i>et al.</i> , 2015
Quelitis comisural	Llamada también "boquera o perleche".	-Angulo de la boca (comisuras)	Pequeñas erosiones, fisuras y finas grietas con formación costrosa a su alrededor cubierta con una débil capa cremosa	-Dolor intenso con gran afectación de la capacidad funcional a escasa	Diferencial: se aísla levadura y <i>Staphylococcus</i>	Rodríguez <i>et al.</i> , 2002; Al-Maskari <i>et al.</i> , 2011; Otero <i>et al.</i> , 2015
Glositis romboidal media	Denominada también "Glositis losángica mediana"	-Región posterior del dorso de la Lengua	-Línea media del dorso lingual formando una área rojiza romboidal plana -No se observa papilas filiformes	-Inflamación -Dolor	Examen clínico de laboratorio: se realiza cultivo para <i>C.albicans</i>	Otero <i>et al.</i> , 2015
Lengua negra vellosa	Denominada "Lengua negra pilosa"	-Tercio medio de la lengua pero puede extenderse por toda la superficie	-Aumento del tamaño de las papilas filiformes -Formación de vellosidades de coloración oscura	-Asintomático -Sensación de atragantamiento o mal sabor	Examen clínico bucal	Otero <i>et al.</i> , 2015

Fuente: Elaborada por el Autor.



2.3.6 Opciones terapéuticas para la candidiasis bucal

Las principales enfermedades que hacen vida en la cavidad bucal son de origen microbiano, por lo tanto el uso de sustancias microbicidas es un hecho frecuente. Por su parte, las levaduras del género *Candida* requieren atención especial por su implicación en diversas patologías bucales y su comportamiento patógeno oportunista en pacientes inmunosuprimidos, ancianos y diabéticos (Molina *et al.*, 2008).

El tratamiento contra la candidiasis se realiza mediante terapia antifúngica, el mecanismo de acción de este tipo de antimicrobianos se encuentra dirigido sobre los esteroides de la membrana celular del hongo o contra las enzimas que regulan la síntesis de los ácidos nucleicos, ya sea por vía local (tópica) o sistémica, la decisión de tratar las infecciones superficiales con un agente tópico o sistémico dependerá del hongo involucrado, de su localización y de la extensión de la lesión (Aguirre, 2002; Otero *et al.*, 2015).

Las dos familias de antifúngicos empleados de manera frecuente en el tratamiento de la candidiasis bucal son los polienos y los azoles en forma tópica. Los polienos son fungicidas, su mecanismo de acción lo ejerce mediante la unión directa al esteroide (estructura básica de la membrana celular) de *Candida* en éstos se incluyen la anfotericina B y la nistatina; por su parte los azoles son fungistáticos, actúan sobre la membrana celular deteriorando su permeabilidad, entre los representantes de esta familia encontramos: ketoconazol, fluconazol, itraconazol y miconazol. Los agentes tópicos se encuentran disponibles en enjuagues bucales y tabletas orales (Ugalde, 2008; Williams & Lewis, 2011; Otero *et al.*, 2015).

La aplicación del tratamiento tópico se realiza sobre la zona afectada, el cual requiere un tiempo de contacto suficiente entre el fármaco y la mucosa oral. La prescripción de medicamentos sistémicos se encuentra indicada cuando la infección está más extendida y el paciente no muestra mejoría clínica con la terapia tópica, se usan por vía intravenosa con el fin de evitar



recidivas, se recomienda continuar con la terapia 2 a 3 semanas más allá del cese de los signos y síntomas (García *et al.*, 2014; Otero *et al.*, 2015).

Actualmente el uso de antifúngicos se encuentra limitado debido a factores como baja potencia, baja solubilidad, toxicidad y la aparición de cepas resistentes. Diversos estudios han demostrado que el tratamiento oral con fármacos como el fluconazol, ketoconazol e itraconazol son eficaces contra *Candida*, sin embargo, éstos presentan toxicidad sistémica. Por lo tanto, el uso indiscriminado y prolongado de antifúngicos ha favorecido una selección de microorganismos resistentes, razón que ha motivado el uso de productos de origen natural como una importante alternativa para el tratamiento de infecciones producidas por especies de *Candida* (Glehn & Rodríguez, 2012).

2.3.7 Plantas medicinales: opciones terapéuticas alternativas para la candidiasis bucal

El empleo de plantas medicinales para el tratamiento de problemas de salud humana data desde el año 1700 A.C, es así como las civilizaciones egipcia, china, griega y romana han descrito tratados de especies vegetales y sus usos. A partir de los años setenta la Organización Mundial de la Salud (OMS) incentivó el estudio científico orientado a mejorar y afianzar el conocimiento de las propiedades de las plantas como agentes medicinales y nutricionales para el ser humano (Molina *et al.*, 2008; Milián *et al.* 2010; Glehn & Rodríguez, 2012).

La OMS ha descrito que alrededor de 4 millones de personas emplean plantas medicinales para el cuidado de su salud, por lo que existen investigaciones fitoterapéuticas que sustentan los beneficios de componentes extraídos de las plantas, siendo los extractos, el producto de la planta que representa la principal alternativa con resultados favorables en la disminución de los microorganismos en la mucosa bucal (Molina *et al.*, 2008; Rodríguez, 2015).

El tratamiento de la candidiasis no solo se circunscribe al campo de la medicina convencional, sino también al de la medicina tradicional y natural,



por lo que los fitofármacos, epifármacos, la homeopatía y la acupuntura son unas de las alternativas disponibles. En el caso de los fitofármacos se ha descrito que el ajo, la manzanilla, el romerillo blanco, la sábila, el llantén, la sidra, la menta americana, el jengibre, la canela, el hinojo, el anís, la caléndula entre otros poseen actividad antifúngica (Rodríguez *et al.*, 2002).

Calendula officinalis L. (*Asteraceae*) constituye una opción terapéutica, ya que sus extractos han demostrado actividad antibacteriana contra *Staphylococcus epidermidis*, *Proteus mirabilis* y actividad antifúngica contra *Candida albicans* (Palma, 2014).

En el ámbito odontológico, el empleo de extractos de *C. officinalis* es prometedor, de manera *in vitro* se ha demostrado su actividad anticandida. Los estudios *in vivo* de enjuagues bucales con *C. officinalis* L. han mostrado ser eficaces en la reducción de gingivorragia y contra bacterias periodontopatógenas. Comparaciones de los extractos de *Calendula* con solución de clorhexidina al 20%, han mostrado una disminución del crecimiento bacteriano de la biopelícula dental en un 16,4%, a su vez, también arroja efectos cicatrizantes y acelerador de los procesos de maduración ósea en post extracción dentaria no evidenciados en la soluciones de Clorhexidina (Molina *et al.*, 2008; Faria *et al.*, 2011; Williams & Lewis, 2011).

En los pacientes diabéticos el éxito del tratamiento anticandida va de la mano con la corrección conjunta de los factores sistémicos y los factores locales (xerostomía y la higiene bucal y de las prótesis) (Aguirre, 2002; Ugalde, 2008). Por tanto, las plantas medicinales constituyen una alternativa terapéutica a los medicamentos en el tratamiento de muchas enfermedades (Molina *et al.*, 2008; Milián *et al.* 2010; Glehn & Rodríguez, 2012).



2.4 Métodos empleados para la evaluación de la actividad antifúngica

2.4.1 Importancia

La mayoría de las manifestaciones de candidiasis bucal se encuentran asociadas a la formación de biopelícula por parte de *Candida* spp. la cual trae como consecuencia la resistencia a la terapia antimicrobiana. Es por ello, que la valoración de susceptibilidad antifúngica representa un medio para predecir las concentraciones terapéuticas de fármacos antimicóticos utilizados para tratar una variedad de infecciones por especies del género *Candida* (Ramage *et al.*, 2001).

Las pruebas de susceptibilidad antifúngica tienen como objetivo principal evaluar en el laboratorio (*in vitro*) el comportamiento de un microorganismo ante uno o varios antimicóticos. Los resultados obtenidos de estos ensayos proporcionan una valiosa información acerca de la posibilidad de tratar con éxito a un paciente infectado con un microorganismo fúngico empleando un agente antifúngico específico (Ramírez *et al.*, 2006).

2.4.2 Métodos para evaluar la actividad antimicrobiana

Los métodos para evaluar la actividad antimicrobiana están clasificados, en tres grupos principales: Métodos de difusión, métodos de dilución (ver tabla 3) y bioautografía, un cuarto método es el análisis conductimétrico, el cual detecta el crecimiento microbiano como un cambio en la conductividad eléctrica o impedancia del medio de cultivo (Ramírez & Marín, 2009).

Estos métodos siempre requieren que las concentraciones de las sustancias antifúngicas a evaluar y los inóculos microbianos se encuentren estandarizados con el objetivo de evitar un crecimiento exacerbado, que impida el análisis de los resultados o proporcione resultados errados lo cual puede variar significativamente la respuesta del extracto vegetal o aceite, indicando la necesidad de utilizar concentraciones mayores de éste para inhibir el crecimiento del microorganismo (Ramírez & Marín, 2009).



CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

Es recomendable tomar el inóculo de cultivos en la fase exponencial de crecimiento de un cultivo puro para evitar seleccionar variantes atípicas. Los medios de cultivo más utilizados en dichas técnicas son el agar Mueller Hinton, ya que sus componentes facilitan el crecimiento de diferentes cepas bacterianas y mayor difusión de los antimicrobianos, por su parte para la evaluación de antifúngicos los medios de cultivos empleados son Agar Mueller Hinton suplementado con 2% de glucosa y Agar RPMi 1640 (Ramírez & Marín, 2009).

www.bdigital.ula.ve



Tabla 3. Características de los métodos empleados para la valoración de susceptibilidad antimicrobiana

Método	Fundamento	Inóculo y Medio de cultivo	Material requerido	Ventajas	Desventajas	Referencia
Métodos de difusión						
Difusión en agar (disco)	Basado en el método originalmente descrito por Bauer y colaboradores en 1966.	<u>Inóculo:</u> 1,5x10 ⁵ UFC/mL <u>Medio de cultivo:</u> - Agar Mueller Hinton suplementado con 2% de glucosa - Agar RPMi 1640 suplementado con glucosa al 2%.	Papel filtro Whatman de 6 mm de diámetro impregnados con los diferentes antibióticos Concentración del antimicrobiano estandarizado	- Resultados son altamente reproducibles. - Bajo costo. Categoría de lectura de fácil interpretación por los clínicos. - No requiere equipos especializados. - Normado por el CLSI.	- Brinda información cualitativa o semicuantitativa. - Para microorganismos fúngicos levaduriformes no es muy aceptada la valoración cualitativa de susceptibilidad antifúngica. - Factores inherentes al medio de cultivo, tiempo de generación del microorganismo y principios técnicos pueden afectar los resultados	- Ramírez & Marín, 2009. - Ramírez <i>et al.</i> , 2006. - Jorgenses & Ferraro, 2009
Método de dilución						
Dilución en agar Microdilución en caldo Macrodilución en caldo	Determina la concentración más baja del antibiótico que puede inhibir el crecimiento visible de un microorganismo.	<u>Inóculo:</u> 1,5x10 ⁵ UFC/mL <u>Medio de cultivo:</u> - Caldo o Agar RPMI 1640 suplementado con glucosa al 2%.	- Placas de Petri. - Microplacas. - Tubos de ensayo	- Permiten determinar la Concentración inhibitoria mínima (CIM) de una sustancia antimicrobiana. - Genera un resultado cuantitativo. - Herramienta útil para investigar nuevas sustancias antimicrobianas.	- La preparación manual de las concentraciones de las sustancias antimicrobianas resultan tediosas y laboriosas	- Ramírez & Marín, 2009. - Ramírez <i>et al.</i> , 2006. - Jorgenses & Ferraro, 2009

CLSI: Clinical Laboratory Standard Institute. **CIM:** Concentración Inhibitoria Mínima. **UFC:** Unidad Formadora de colonias.

Fuente: Elaborada por el Autor.



www.bdigital.ula.ve



- La Bioautografía: puede representar una herramienta útil para la purificación de sustancias antimicrobianas, o como técnica preliminar de tamizaje fotoquímico. Se realiza a través de cromatogramas, que permiten la localización de los compuestos activos, incluso en matrices complejas como los derivados de productos naturales. Se puede definir como una variación de los métodos de difusión en agar, donde el analito es absorbido dentro de una placa de cromatografía delgada TLC.

El método consiste en colocar las muestras a evaluar en placas de TLC, se selecciona la fase móvil que permita una mejor separación, posteriormente esta placa es llevada y colocada en forma invertida sobre una placa de Petri previamente inoculada con el microorganismo a evaluar, se deja de 8 a 12 horas en la nevera para facilitar la difusión de los extractos en el medio, luego se retira la placa y se lleva la placa a incubación según los requerimientos del microorganismo; luego se observa el halo de inhibición donde está el compuesto activo. Para visualizar mejor los resultados se puede utilizar alguna sal de tetrazolium (Ramírez & Marín, 2009).

- Métodos comerciales: de mayor utilización en los laboratorios de microbiología por su factibilidad y buena concordancia con los métodos de dilución en caldo, el método Etest® (AB BioDisk, Solna, Sweden) se encuentra aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) para susceptibilidad a los antifúngicos *in vitro* por parte de *Candida* spp. Es un método simple, que involucra la inoculación del hongo en la superficie de un agar, seguido de la aplicación de una tira plástica impregnada con un gradiente de concentración del antifúngico, lo cual permite determinar la CIM. Luego, la placa se incuba a 37 °C por 24 a 48 horas y se genera una elipse de inhibición que permite obtener la CIM. Se ha utilizado en levaduras y en hongos filamentosos y se han probado distintos medios siendo el más utilizado, RPMI suplementado con glucosa al 2% (Tapia, 2009).



Actualmente se encuentra disponible en el mercado un método automatizado para determinar CIM, Vitek 2® (Biomérieux), que utiliza una lectura espectrofotométrica, la cual facilita la lectura de la CIM. Tiene la ventaja de encontrarse acoplado a la identificación de levaduras. Un estudio multicéntrico reveló un alto nivel de reproducibilidad de los resultados y una concordancia de 93,7 a 97,9% con el método de dilución en caldo. Además, los resultados pueden obtenerse a partir de las 10 hasta las 26 horas de incubación (Tapia, 2009).

www.bdigital.ula.ve



CAPÍTULO III MARCO METODOLÓGICO

3.1 Tipo de investigación

El siguiente trabajo de investigación es de tipo explicativo y descriptivo ya que es un tema poco estudiado, por lo que sus resultados constituyen una visión aproximada de dicho objeto (Hernández, Fernández y Baptista, 2003). En este estudio se realizó una evaluación de la actividad antifúngica *in vitro* de los extractos etanólico, acetónico y hexánico de flores de *Calendula officinalis* L. sobre aislados de *Candida albicans* provenientes de lesiones bucales en pacientes diabéticos tipo 2.

3.2 Sistema de variables

3.2.1 Variable independiente

La actividad biológica de las moléculas presentes en los diferentes extractos obtenidos de flores de *Calendula officinalis* L.

3.2.2 Variable dependiente

El crecimiento de los aislados de *Candida albicans* en agar Saboraud dextrosa suplementado con extractos de flores de *Calendula officinalis* L.

3.3 Hipótesis

“Los extractos etanólico, acetónico y hexánico de flores de *Calendula officinalis* a concentraciones de 50µg/mL y 100µg/mL poseen actividad antifúngica sobre los aislados de *Candida albicans* obtenidos de lesiones bucales en pacientes diabéticos tipo 2”.



3.4 Instrumentos y recolección de datos.

En la presente investigación se empleó la técnica directa de observación, utilizando una libreta de anotaciones donde se registraron los resultados obtenidos.

3.5 Especímenes Biológicos

Se empleó una colección de 11 cepas (ver tabla 4 y figura 3a) de *Candida albicans* aisladas de lesiones bucales en pacientes diabéticos tipo 2, pertenecientes al Cepario del proyecto “Candidiasis Bucal: aspectos clínicos, epidemiológicos y microbiológicos” del Laboratorio de Diagnóstico e Investigaciones Microbiológicas “Dra. Celina Araujo de Pérez” del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes. Los especímenes biológicos se encontraban conservados en caldo BHI con 20% de glicerol a -20°C.

Tabla 4. Especímenes biológicos empleados para la determinación de actividad antifúngica

Cepa control	Nombre: <i>Candida albicans</i> CVCM: 385 Referencias: Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel.
Cepas a estudiar	Nombre: <i>Candida albicans</i> Codificación: 35, 27L1a, 13L2a, 16 Rca, 33L1a, 29, 02, 47, 23L, 07E y 55 Referencia: Cepario del proyecto “Candidiasis Bucal: aspectos clínicos, epidemiológicos y microbiológicos” del Laboratorio de Diagnóstico e Investigaciones Microbiológicas “Dra. Celina Araujo de Pérez” del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis. Universidad de Los Andes.

Fuente: Elaborada por el Autor.

Los extractos de las flores de *Calendula officinalis* fueron obtenidos en 2015, durante el desarrollo del Trabajo especial de Grado titulado “Actividad antibacteriana de extractos de flores de *Calendula Officinalis* L. sobre



Streptococcus mutans CVCM 656 y *Lactobacillus acidophilus* CVCM 610” por las Odontólogos Greymar Soto y Aury Sánchez (Soto y Sánchez, 2015). Los extractos se mantuvieron conservados a temperatura ambiente en envases color ámbar hasta su utilización (ver figura 3c).

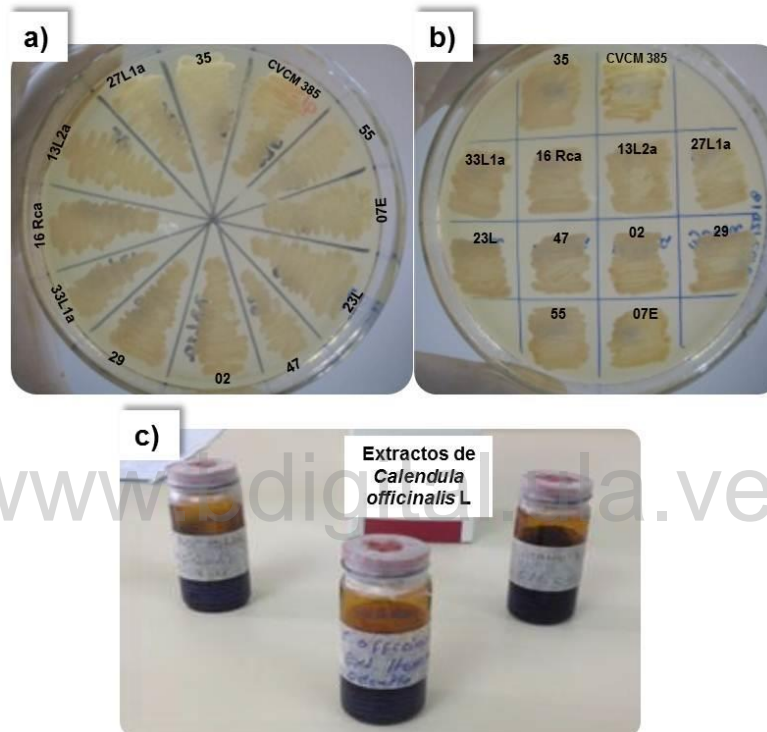


Figura 3. Especímenes biológicos. a) Colección de cepas de *Candida albicans*. b) colección de cepas reactivadas. c) Extractos de *Calendula officinalis* L.

Fuente: Elaborada por el autor.

3.6 Procedimiento

3.6.1 Reactivación de la colección de cepas y preparación del inóculo

Los aislados de *Candida albicans*, fueron descongelados progresivamente hasta alcanzar temperatura ambiente posteriormente, se inocularon 20 μ L en agar Saboraud Dextrosa, y se incubaron durante 24 horas a 35 $^{\circ}$ C en aerobiosis (ver figura 3b).



Se verificó la pureza de las cepas mediante de la observación de las características macroscópicas de las colonias obtenidas y la observación microscópica de las células fúngicas mediante examen directo en solución salina fisiológica estéril.

El inóculo se preparó a partir de colonias aisladas que fueron resuspendidas en solución fisiológica estéril hasta alcanzar una turbidez equivalente al patrón 0,5 de McFarland (1×10^6 a 5×10^6 células/mL) (ver figura 4d-e).

3.6.2 Actividad antifúngica

3.6.2.1 Preparación de la solución stock del extracto.

Se preparó una dilución 1:10 pesando $10000 \mu\text{g}$ (10mg) de cada extracto a evaluar y diluyéndolo en un tubo de ensayo que contiene 10 mL Dimetilsulfoxido (DMSO), obteniendo una solución Stock equivalente a $1000 \mu\text{g/mL}$ de concentración

Para la concentración equivalente a $100 \mu\text{g/L}$ de cada extracto, se agregó 2mL de la solución Stock en 18 mL Agar Sabouraud temperado. Para la concentración equivalente a $50 \mu\text{g/L}$ de cada extracto, se agregó 1mL de la solución Stock en 19 mL Agar Sabouraud temperado, posteriormente se vertió en placas de Petri y se permitió su solidificación (ver figura 4b-c).

3.6.2.2 Inoculación de las placas

Una vez solidificadas las placas, estas fueron inoculadas con $5 \mu\text{L}$ de una suspensión equivalente a 0,5 McFarland de cada aislado fúngico sobre la superficie del agar, conservando una distancia prudente entre cada una de ellas. Se permitió la absorción y se incubaron a $35 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 24 a 72 horas (ver figura 4f).



3.6.2.3 Determinación de la actividad antifúngica de los extractos

La actividad antifúngica se determinó observando la presencia o ausencia de crecimiento fúngico a las concentraciones evaluadas durante tres intervalos de tiempo de incubación 24 horas, 48 y 72 horas.

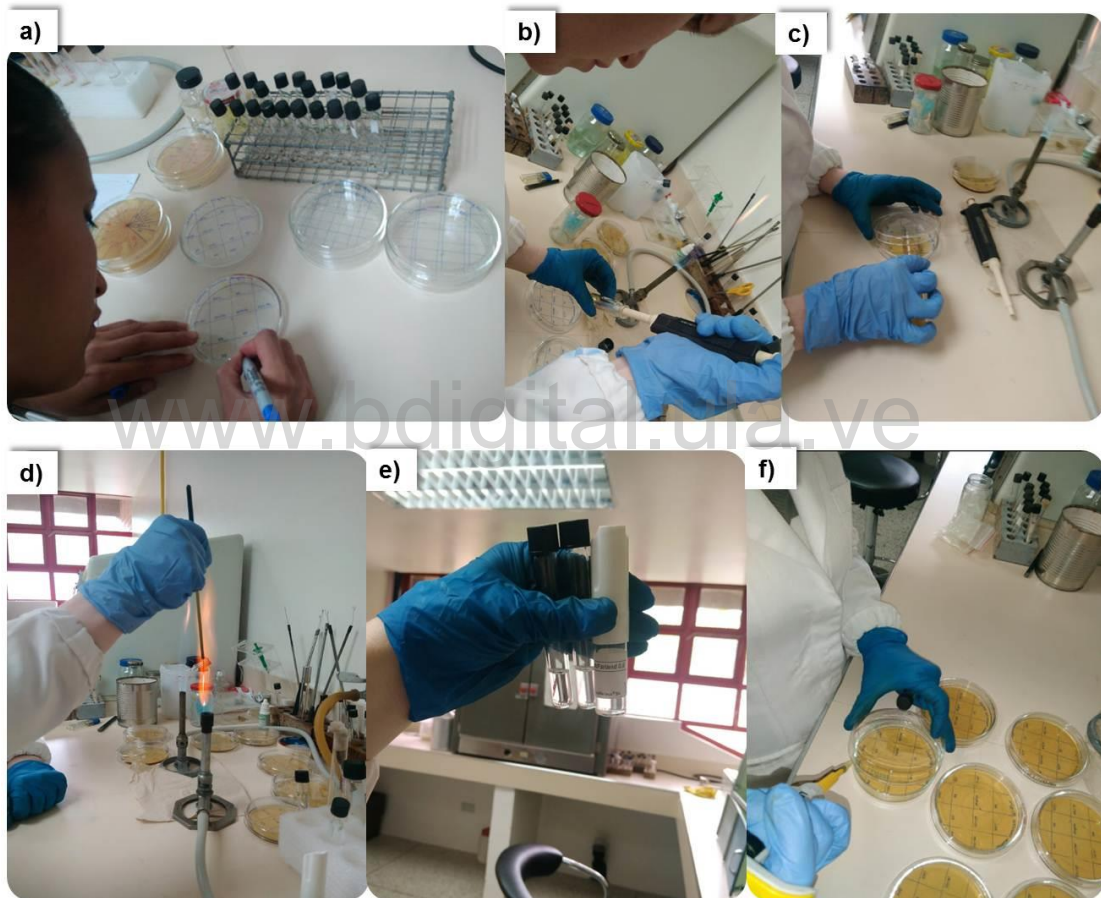


Figura 4. Prueba para la actividad antifúngica. a) Rotulación de las placas. b) Preparación de la solución stock del extracto. c) mezcla del extracto con el agar Sabouraud Dextrosa. d-e) Preparación del inóculo equivalente a 0,5 McFarland. f) Inoculación de las placas con la suspensión fúngica.

Fuente: Elaborada por el autor.



CAPÍTULO IV RESULTADOS

Extractos a concentración 50 µg/mL

Al evaluar el efecto antifúngico de los extractos a una concentración de 50 µg/mL no se observó efecto fungicida a las 24 horas en un alto porcentaje de las cepas de *Candida albicans* analizadas. Salvo las siguientes excepciones

- Extracto etanólico: las cepas CVCM 385 y 35 presentaron crecimiento incipiente.
- Extracto acetónico: la cepa 27L1a presentó un crecimiento incipiente y en la cepa 13L2a se observó ausencia de crecimiento.
- Extracto hexánico: las cepas 27L1a y 33L1a presentaron crecimiento incipiente (ver tabla 4).

Por su parte, la evaluación a las 48 horas de incubación respecto a las 24 horas anteriores evidenció:

- Extracto etanólico: la cepa CVCM 385 presentó crecimiento, mientras que la cepa 35 mantuvo su crecimiento incipiente.
- Extracto acetónico: la cepa 27L1a mostró crecimiento y en la cepa 13L2a se observó crecimiento incipiente.
- Extracto hexánico: las cepas 27L1a y 33L1a presentaron crecimiento mayor al observado en las 24 horas anteriores de incubación (ver tabla 5).

Así mismo la evaluación a las 72 horas de incubación, demostró que no hubo diferencia significativa respecto a la observación realizada a las 48 horas (ver tabla 5 y Anexo 1).

Extractos a concentración 100 µg/mL

La actividad antifúngica de los extractos a una concentración de 100 µg/mL mostró mejores resultados inhibitorios de crecimiento fúngico respecto a la concentración de 50 µg/mL, observándose para las 24 horas de incubación



ausencia de crecimiento de *C. albicans* en la mayoría de las cepas, con las siguientes excepciones:

- Extracto etanólico: la cepa 33L1a presentó crecimiento incipiente.
- Extracto acetónico: la cepa 23L presentó un crecimiento incipiente y en la cepa 13L2a se observó ausencia de crecimiento.
- Extracto hexánico: la cepa 27L1a presentó un crecimiento incipiente.

La actividad antifúngica se mantuvo similar durante las 48 y 72 horas siguientes de incubación, sin embargo en el extracto hexánico la cepa 29 presentó un crecimiento incipiente, el cual no había sido observado durante las 24 y 48 horas anteriores de incubación (ver tabla 5).

Al relacionar la actividad biológica de las dos concentraciones evaluadas de los extractos se evidenció que la concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$ presentó una actividad fungistática en contraste con la concentración 100 $\mu\text{g/mL}$ que demostró una actividad fungicida para la mayoría de las cepas de *C. albicans* evaluadas (ver tabla 5 y Anexo 2).



Tabla 5. Características de los métodos empleados para la valoración de susceptibilidad antimicrobiana

CEPA	EXTRACTO ETANOLICO						EXTRACTO ACETÓNICO						EXTRACTO HEXÁNICO					
	24 horas		48 horas		72 horas		24 horas		48 horas		72 horas		24 horas		48 horas		72 horas	
	50 µg/mL	100 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL
CVCM*	-/+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
35	-/+	-	-/+	-	-/+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
27L1a	+	-	+	-	+	-	-/+	-	+	-	+	-	-/+	-/+	+	-/+	+	-/+
13L2a	+	-	+	-	+	-	-	-	-/+	-	-/+	-	+	-	+	-	+	-
16Rca	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
33L1a	+	-/+	+	-/+	+	-/+	+	-	+	-	+	-	-/+	-	+	-	+	-
29	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-/+
02	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
47	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
23L	+	-	+	-	+	-	+	-/+	+	-/+	+	-/+	+	-	+	-	+	-
07E	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
55	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-

-: Ausencia de crecimiento. +: Presencia de crecimiento. +/-: Crecimiento incipiente. CVCM*: *Candida albicans* CVCM 385

Fuente: Elaborada por el Autor.



CAPÍTULO V DISCUSIÓN

La amplia riqueza de los recursos herbales en el mundo oscilan entre 250.000 y 500.000 especies conocidas, no obstante este recurso no se aprovecha de manera adecuada a pesar de que su uso en el tratamiento de enfermedades es ancestral (Mesa *et al.*, 2004). El empleo de plantas medicinales es una costumbre que se ha mantenido hasta nuestros días principalmente en poblaciones rurales, lo que ha permitido recopilar un amplio conocimiento etno-farmacológico constituyendo el punto de partida para investigaciones dirigidas en la búsqueda de moléculas activas con efectos terapéuticos y antimicrobianos (Mesa *et al.*, 2004; Soto & Sánchez, 2015) como el llevado a cabo en esta investigación.

En los pacientes diabéticos la polimedicación constituye un problema de salud pública no solo por su prevalencia sino por su constante incremento ya que este hecho va estrechamente relacionado con el envejecimiento de la población (Gavilán *et al.*, 2012). A pesar de que los medicamentos constituyen las herramientas terapéuticas claves para el manejo de múltiples enfermedades, éstos traen consigo efectos indeseados tanto a nivel clínico como en la calidad de vida y la dependencia del paciente producto de los efectos colaterales que éstos causan, además de las repercusiones económicas para el paciente y el Estado (Castellano & Cruz, 2012; Gavilán *et al.*, 2012), es por ello que cuando estos pacientes presentan infecciones ya sean bacterianas o fúngicas asociadas a su enfermedad de base, la búsqueda de efectos saludables y antimicrobianos que permitan minimizar los efectos adversos de estas terapias farmacológicas conllevan al auge e incremento del uso de extractos de plantas como opciones terapéuticas coadyuvantes o como monoterapias.

A lo largo de la historia se ha descrito el empleo empírico de *Calendula officinalis* L para el tratamiento de diversas afecciones del hombre como respuesta a la falta de accesibilidad a los tratamientos médicos tradicionales y



a los elevados costos de los mismos, de hecho existen diversos estudios tanto en modelos murinos (ratas y hamsters) como modelos clínicos que validan las propiedades terapéuticas de los extractos de esta planta tales como: propiedades antiinflamatorias (Aro *et al.*, 2012; Buzzi *et al.*, 2016^(a)), regeneración de tejido bajo el empleo como tratamiento tópico para mejorar la cicatrización de úlceras en pacientes diabéticos (Buzzi *et al.*, 2016^(b)), en el tratamiento y cicatrización de lesiones bucales post-extracción dental (Uribe *et al.*, 2016), como tratamiento antibacteriano en piel y mucosas contra *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*, bacterias periodontopatógenas y como antifúngico contra *Candida albicans* (Gazim *et al.*, 2008; Molina *et al.*, 2008; Muley *et al.*, 2009; Faria *et al.*, 2011; Palma, 2014).

La candidiasis en los pacientes diabéticos tipo 2 constituye un problema microbiológico producto de la persistencia de diversos factores predisponentes que favorecen la colonización e infección por *Candida* (Aguirre, 2002, Rodríguez *et al.*, 2002; Añez *et al.*, 2009, Otero *et al.*, 2015). El incremento de la colonización bucal por *C. albicans* en estos pacientes se encuentra mediada por el desequilibrio metabólico de carbohidratos que estas personas presentan y los microambientes anaeróbicos que crean el uso de las prótesis en conjunto con la disponibilidad de sustratos y el favorecimiento de formación de biopelículas lo que conlleva al desarrollo de candidiasis bucal (Gendreau & Loewy, 2011; Suarez *et al.*, 2013; Zomorodian *et al.* 2016; Llanos *et al.* 2017), ameritando el uso de tratamiento antifúngico donde los extractos de plantas como *Calendula officinalis* L constituyen una opción terapéutica natural y alternativa.

La elaboración de extractos naturales permite la obtención de los principales componentes de una planta o parte de ésta en una mezcla, la cual mediante diversos procesos de separación y cuantificación, muestra la proporción de los diversos constituyentes que se encuentran presentes, tal como fue realizado por Soto y Sánchez en el 2015 cuya investigación contempló la elaboración de



los extractos de flores de *Calendula officinalis* L empleados en esta investigación (Soto & Sánchez, 2015).

Los extractos etanólico, acetónico y hexánico empleados en este trabajo en concentraciones de 100 µg/ml y 50 µg/ml mediante la técnica de dilución en agar demostraron actividad biológica *in vitro* de tipo antifúngica, donde la mayor concentración evidenció un efecto fungicida y la menor un efecto fungistático, siendo concordante con estudios realizados por El Astal *et al.*, 2005 quienes realizaron una comparación de las características inhibitorias de 5 extractos de *Calendula officinalis* sobre *Candida albicans* y bacterias Gram positivas y Gram negativas demostrando efectos inhibitorios en concentraciones terapéuticas normales y altas diluciones mediante la técnica de difusión en disco (El Astal *et al.*, 2005), del mismo modo en el 2008 Gazim *et al.*, evaluaron la actividad *in vitro* del aceite esencial de flores de *C. officinalis* evidenciando actividad antifúngica contra 23 cepas de *Candida* sp., y para el año 2010 Milian *et al.*, evaluaron la propiedad antimicótica de un extracto acuoso de *C. officinalis* reservado durante un año luego de su elaboración evidenciando actividad biológica y conservación de las características fisicoquímicas del mismo (Milian *et al.*, 2010). Por lo tanto, la evaluación *in vitro* constituye un pilar fundamental que dirige las investigaciones de nuevas opciones terapéuticas antifúngicas, donde la evaluación de concentraciones intermedias que contemplen el rango empleado en este trabajo son necesarias.

Entre los principales constituyentes de los extractos *Calendula officinalis* L se han descrito la presencia de flavonoides, carotenoides, polisacáridos, saponinas, triptenos, ácidos fenólicos, cumarinas y taninos (Millán *et al.*, 2010; Gordo, 2015; Ojeda, 2016). Si bien, la presente investigación empleó los extractos en su totalidad, Soto y Sánchez investigaron los principales componentes de los extractos encontrando que el extracto hexánico estaba compuesto de flavonoides; fenoles y taninos; cumarinas, triptenos y esteroides en el caso



del extracto de etanol presenta compuestos como alcaloides, cumarinas, tripterenos y esteroides. Posteriormente los extractos de hexano y acetona fueron analizados por Cromatografía de gases destacando que el extracto de hexano el componente mayoritario es el alfa cadinol (13,09 %) seguido del delta cadineno (11,15 %) y el ácido hexadecanoico (9,92 %). Por otra parte el extracto acetónico el componente mayoritario es el delta cadineno (9,81 %) seguido del alfa amorfeno (9,62 %) y la Oplopanoa (5,54 %) (ver anexo 3, 4 y 5). La mencionada composición nos permite indicar que los componentes mayoritarios de los extractos evaluados en este estudio pertenecen a familia de los sesquiterpenos, cuyo mecanismo antifúngico no ha sido esclarecido aún.

En este sentido, es importante realizar evaluaciones que permitan determinar de manera separada la actividad antifúngica de cada uno de los principales componentes del extracto, a fin de explorar que no se trate de una actividad sinérgica entre éstos (Vizcaya *et al.*, 2014). Por otra parte, las sustancias activas de *Calendula officinalis* pueden verse afectadas o desaparecer en los pasos de los métodos de extracción de estos extractos, así como también, las cepas pueden verse alteradas por cambios genéticos y cambios conformacionales de las estructuras diana de los sitios de acción de las moléculas con actividad antifúngica, lo que podría explicar el comportamiento biológico (crecimiento incipiente) de un grupo de cepas analizadas en este estudio.



CAPÍTULO VI CONCLUSIÓN

Con los análisis realizados en esta investigación, se observó que:

1. Los extractos etanólico, acetónico y hexánico de flores de *Calendula officinalis* L. presentaron actividad biológica de tipo fungicida y fungistática sobre la colección de cepas de *Candida albicans* evaluadas.
2. Los extractos preparados a una concentración de 50 µg/mL presentaron actividad de fungistática.
3. Los extractos preparados a una concentración de 100 µg/mL presentaron actividad de fungicida.
4. No se observó diferencia de la actividad antifúngica entre cada uno de los extractos evaluados; es decir, los tres extractos evaluados en las concentraciones de 50 µg/mL y 100 µg/mL no demostraron diferencias significativas respecto a su espectro de acción en la colección de *Candida albicans* evaluada.
5. A pesar que los extractos de 100 µg/mL de concentración demostraron actividad fungicida, se observó el crecimiento de cuatro (4) cepas: para el extracto etanólico y acetónico hubo crecimiento de una (1) cepa y para el extracto hexanólico (2) dos cepas, donde una de ellas evidenció crecimiento incipiente a las 72 horas de incubación, lo que permite indicar que este comportamiento diferente al observado en la mayoría de las cepas evaluadas se debe a características intrínsecas de las cepas de *C. albicans*.
6. Esta investigación ofrece resultados microbiológicos promisorios que permitieron evaluar la actividad antifúngica de los extractos sobre una colección de cepas provenientes de infecciones de cavidad bucal en pacientes diabéticos tipo 2, pudiendo ser sugerido como tratamiento alternativo coadyuvante o de primera línea para la candidiasis bucal.



CAPÍTULO VII RECOMENDACIONES

1. Continuar realizando estudios de susceptibilidad antifúngica que permitan establecer la concentración inhibitoria mínima que abarque un rango de concentraciones entre las evaluadas en esta investigación.
2. Realizar análisis fitoquímicos adicionales que permitan la obtención de las moléculas puras de cada extracto a fin de continuar las valoraciones antifúngicas *in vitro* que permitan establecer si el actividad antifúngica observada en esta investigación es debida a un efecto sinérgico entre los principales componentes o de un sólo componente.
3. Se sugiere realizar posteriores verificaciones de la actividad antifúngica empleado la técnica estandarizada por el CLSI (Clinical Laboratory Standard Institute) en su documento M27 suplemento 4 empleando la técnica de microdilución y medio de cultivo RPMI 1640



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguirre, J. (2002). Candidiasis Orales. *Revista Iberoamericana Micología*, 19:17-21.
- Akpan, A., & Morgan, R. (2002). Oral Candidiasis. *Postgraduate Medical Journal*, 78(192), 455-459. <https://doi.org/10.1136/pmj.78.922.455>
- Al-Maskari, A., Al-Maskari, M., & Al-Sudairy, S. (2011). Oral Manifestations and Complications of Diabetes Mellitus: A review. *Sultan Qaboos University Medical Journal*, 11(2), 179-186.
- American Diabetes Association. (2014). Diagnosis and classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, 37(Suppl.1), S81-S90.
- Añez, E., Rojas, T., Calleja, J., & Navas, R. (2009). Candidiasis Bucal: Una revisión sistemática de las pruebas de laboratorio. *Acta Odontológica Venezolana*, 47(3), 16-18.
- Aro, A., Nishan, U., Perez, M., Rodrigues, R., Foglio, M., Cavalho, J., et al. (2012). Structural and biochemical alterations during the healing process of tendons treated with Aloe vera. *Life Science Alliance*, 91(17-18):885–893. <https://doi.org/10.1016/j.lfws.2012.09.002>
- Arora, D., Rani, A., & Sharma, A. (2013). A review on phytochemistry and ethnopharmacological aspects of genus *Calendula*. *Pharmacognosy Review*, 7(14), 179-187.
- ^(a)Buzzi M, de Freitas F, Winter M. (2016). A prospective, descriptive study to assess the clinical benefits of using *Calendula officinalis* hydroglycolic extract for the topical treatment of diabetic foot ulcers. *Ostomy Wound Manage*, 62(3), 8–24.
- ^(b)Buzzi, M., Freitas, F., & Barros, M. (2016) Therapeutic effectiveness of a *Calendula officinalis* extract in venous leg ulcer healing. *Journal Of Wound Care*, 25(12), 732-739
- Castellano, C., & Cruz, A. Los medicamentos, un arma de dos filos. (2012). *Revista Española de Geriatria y Gerontología*, 47(4), 141-142. <http://dx.doi.org/10.1016/j.regg.2012.03.005>
- Cepero, A., Pérez, A., Sánchez, O. M., & Rodríguez, R. (2017). Estado de Salud bucal y diabetes mellitus asociada en adultos mayores. *MEDIMAY*, 24(2), 112-123.
- Chen, L., Magliano, D., & Zimmet, P. (2012). The worldwide epidemiology of type 2 diabetes mellitus—present and future perspectives. *Revista de Endocrinología*, 8(1), 228–236. <http://dx.doi.org/10.1038/nrendo.2011.183>
- Da Silva, W., Brito, V., Estivallet, T., Pipolo, E., & Maranhão, G. (2014). *Candida* species distribution, genotyping and virulence factors of *Candida*



- albicans isolated from the oral cavity of kidney transplant recipients of two geographic regions of Brazil. *BMC Oral Health*, 14(20), 1-9. <https://doi.org/10.1186/1472-6831-14-20>
- De la Rosa, E., Miramontes, M., Bustos, J., & Mondragón, A. (2013). Especies de *Candida* en candidosis bucal en pacientes diabéticos con y sin insuficiencia renal crónica. *Revista ADM*, 70(6), 302-308.
- El Astal, Z., Ashour, A., & Kerit, A. (2005). Antimicrobial activity of some medicinal plant extracts. *Pakistan Journal of Medical Sciences*, 21(2), 187-193.
- Estrada, G., Márquez, M., Díaz, J., & Agüero, L. (2015). Candidiasis bucal en pacientes con diabetes *mellitus*. *Medisan*, 19(11), 1317-1324.
- Faria, R., Cardoso, M., Akisue, G., Pereira, C., Junqueira, J., Jorge, A., & Santos, P. (2011). Antimicrobial activity of *Calendula officinalis*, *Camellia sinensis* and chlorhexidine against the adherence of microorganisms to sutures after extraction of unerupted third molars. *Journal of applied oral science*, 19(5), 476-482.
- Fernández, M., Jaimés, A., Hernández, F., & Fabian, G. (2013). Oral *Candida* spp carriers: its prevalence in patients with type 2 Diabetes Mellitus. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 88(2), 222-225.
- García, C., Sarrión, M., & Bagán, J. (2014). Current treatment of oral candidiasis: A literature review. *Oral Medicine and Pathology*, 6(5), 576-582. doi: <https://doi.org/10.4317/jced.51798>
- Gavilán, E., Villafaina, A., Jiménez, L., & Gómez, M. (2012). Ancianos frágiles polimedicados: ¿es la deprescripción de medicamentos la salida?. *Revista Española de Geriátría y Gerontología*, 47(4), 162-167. <http://dx.doi.org/10.1016/j.regg.2012.01.003>
- Gazim, Z, Moraes, C., Fraga, S., Estivaleti, T., & García, D. (2008). Antifungal activity of the essential oil from *Calendula officinalis* L. (*Asteraceae*) growing in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39(1), 61-63. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822008000100015>
- Gendreau, L., & Loewy Z. (2011). Epidemiology and etiology of denture stomatitis. *Journal of Prosthodontics*, 20(4), 251-260.
- Glehn, E., y Rodrigues, G. (2012). Antifungigrama para comprobar o potencial de ação dos extratos vegetais hidroglicólicos sobre *Candida* sp. (Berkhout). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 14(3), 435-438.
- Gordo, M. (2015). *Aspectos químicos y bioactivos de tres matrices naturales: Calendula officinalis L., Mentha cervina L. y Macrolepiota procera (Scop.)* (Tesis de Maestría). Instituto Politecnico Bragança, Bragança, Portugal.



- Hernández, S., Fernández, R., & Baptista, L. Metodología de la investigación, editorial Mc. Gram Hill. 4ta edición; 2003.
- Jafari, A., Khanpayah, E., & Ahadian. H. (2013). Comparison the Oral *Candida* Carriage in Type 2 Diabetic and Non Diabetics. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 6(7), e8495. <http://dx.doi.org/10.5812/jjm.8495>
- Jorgenses, H., & Ferraro, M. (2009). Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clinical Infectious Disease*, 49(11), 1749-1745. <https://doi.org/10.1086/647952>.
- Linares, N., Zavaleta, S., Siapo, F., Vásquez, A., & Cconchoy, F. (2017). Manifestaciones orales en pacientes con diabetes mellitus Tipo 2 atendidos en el Hospital Alberto Sabogal. *KIRU*, 14(1), 19-27. <http://dx.doi.org/10.24265/kiru.2017.v14n1.03>
- Llanos, I., Montoya, R., Puello, M., Young, G., Correa, O. & Suárez, P. (2017). Portación de *Candida* spp. en cavidad oral en diabéticos y no diabéticos. *Revista cubana de Endocrinología*, 28(3), 1-11.
- Mayer, F., Wilson, W., & Hube, B. (2013). *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*, 4(2), 119-128. <https://doi.org/10.4161/viru.22913>
- Mendoza, M. (2005). Importancia de la identificación de levaduras. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 25(1), 103-117.
- Mesa, C., Bueno, J., & Betancur, L. (2004). Productos naturales con actividad antimicótica. *Revista Española de Quimioterapia*, 17(4), 325-331.
- Milián, P., Seife, J., Morales, R., Vásquez, L., Martín, C., & Quiros, M. (2010). *Calendula officinalis* L. en el tratamiento tópico de la candidiasis vaginal recurrente. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticos*, 9(5), 343-352.
- Molina, F., Majewski, M., Perrela, F., Oliveira, L., Junqueira., J., & Jorge, A. (2008). Própolis, salvia, calendula e mamona-actividad antifungal activity of natural extracts on *Candida albicans* strains. *Ciência odontológica brasileira*, 11(2), 86-93.
- Muley, B., Khadabadi, S., & Banasare, N. (2009). Phytochemical constituents and pharmacological activities of *Calendula officinalis* Linn (*Asteraceae*): A Review. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 8(5), 455-465.
- National Center for Biotechnology Information (NCBI). (2018). Taxonomy Browser. [Base de datos en línea]. Consultada el 15 de junio de 2018 en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>
- Negrato, C., & Tarzia, O. (2010). Buccal alterations in diabetes mellitus. *Diabetology & Metabolic Syndrome*, 2(3), 1-11. <https://doi.org/10.1186/1758-5996-2-3>



- Ojeda, J. (2016). *Evaluación farmacológica del extracto de **Calendula officinalis*** (Tesis Pregrado). Instituto Politécnico Nacional. Unidad Profesional interdisciplinaria de Biotecnología, Ciudad de México.
- Otero, R., Peñamaría, M., Rodríguez, M., Martín, B., & Blanco, A. (2015). Candidiasis oral en el paciente mayor. *Avances en Odontostomatología*, 31(3), 135-148.
- Palma, M. (2014). *Cuantificación de flavonoides y carotenoides en variedades de calendula (*Calendula officinalis* L.) y descriptores varietales* (Tesis doctoral). Instituto de Enseñanza e investigación en Ciencias Agrícolas, Montecillo, Texcoco, México.
- Pardi, G., & Cardozo, E. (2002). Algunas consideraciones sobre *Candida albicans* como agente etiológico de candidiasis bucal. *Acta Odontológica Venezolana*. 40(1), 9-17.
- Patil, S., Rao, R. S., Majumdar, B., & Anil. S. (2015). Clinical Appearance of Oral Candida Infection and Therapeutic Strategies. *Frontiers in Microbiology*. 6(1391), 1-10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01391>
- Ramage, G., Walle, K., Wickes, B., & López, J. (2001). Standardized Method for In Vitro Antifungal Susceptibility Testing of *Candida albicans* Biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(9), 2475-2479. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.45.9.2475-2479.2001>
- Ramírez, A., García, E., Longa, A., & Mosqueda, N. Primera Edición. 2006. Manual Práctico de Bacteriología general. Mérida, Venezuela: Editorial Venezolana, C.A.
- Ramírez, L., & Marín, D. (2009). Metodologías para evaluar *in vitro* la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et Technica*, 15(42), 263-268
- Rioboo, M., Planells, P., & Rioboo, R. (2004). Epidemiología de la Patología de la mucosa oral frecuente en niños. *Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal*, 10(5), 376-387.
- Rodríguez, J., Miranda, J., Morejón, H., & Santana, J. (2002). Candidiasis de la Mucosa bucal. Revisión Bibliográfica. *Revista Cubana de Estomatología*, 39(2), 127-233.
- Rodríguez, O. (2015). *Evaluación fitoquímica y Microbiológica de Extractos naturales y su incorporación en nanopartículas poliméricas para su aplicación odontológica* (Tesis doctoral). Universidad Autónoma de Nuevo León, Ciudad Universitaria San Nicolás de los Garza, México.
- Rojas, T., Rubio, E., Viera, N., Morón, A., & Meza, L. (2013). Características clínicas y microscópicas de *Candida albicans* en pacientes con diabetes tipo 2. *Revista de Facultad de Medicina. Universidad de los Andes*, 22(1), 6-10.



- Safdar, W., Majeed, H., Naveed, I., Kayani, W., Ahmed, H., Hussain, A., y Kamal, A. (2010). Pharmacognostical study of the medicinal plant *Calendula officinalis* L. (family *Compositae*). *Internacional Journal of Cell & Molecular Biology*, 1(2), 108-116.
- Sánchez, O., Pérez, A., Fonseca, Y., Cepero, A., Calzadilla, X., & Bertrán, G. (2017). Influencia de la diabetes mellitus en la salud bucal del adulto mayor. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 16(3), 2-10.
- Sanz, I., & Bascones, A. (2009). Diabetes mellitus: Su implicación en la patología oral y periodontal. *Avances en Odontoestomatología*, 25(5), 249-263.
- Schmiderer, C., Lukas, B., Ruzicka, J., & Novak, J. (2015). DNA-based identification of *Calendula officinalis* (asteraceae). *Applications in Plant Sciences*, 3(11), 1-6. <https://doi.org/10.3732/apps.1500069>
- Soto, G., & Sánchez, A. (2015). *Actividad antibacteriana de extractos de flores de Calendula Officinalis L. sobre Streptococcus mutans CVCM 656 Y Lactobacillus acidophilus CVCM 610* (Tesis de pregrado). Universidad de Los Andes. Facultad de Odontología, Mérida, Venezuela.
- Suarez, L., Alvarez, M., Bernal, M., & Collazos, A. (2013). *Candida* species and other yeasts in the oral cavities of type 2 diabetic patients in Cali, Colombia. *Colombia Médica*, 44(1), 26-30.
- Sudhakar, M., Pawar, B., Parashram, P. & Mani, A. (2013). Evaluation of *Calendula officinalis* as an anti-plaque and anti-gingivitis agent. *Journal of Indian Society of Periodontology*, 17(6), 741-747. <https://doi.org/10.4103/0972-124X.124491>
- Tapia. C. (2009). Actualización en Pruebas de Susceptibilidad antifúngica. *Revista Chilena de Infectología*, 26(2), 144-150.
- Torrealba, B., Vielma, E., Salas, E., Carrero, S, Martínez, C., Moreno, J., Varela, Y., & Jiménez, J. (2016). Especies de *Candida* asociadas a lesiones bucales en pacientes con diabetes tipo 2. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 36(2), 58-62.
- Ugalde, C. M., (2008). *Prevalencia de especies de Candida en la cavidad oral en pacientes diabéticos Tipo 2* (Tesis doctoral). Universidad de Granada. Departamento de Estomatología. Facultad de Odontología, Granada, México.
- Urbizo, D., Pérez, E., Espinoza, T., & Jiménez, T. (2017). Alteraciones bucales asociadas a *diabetes mellitus* Tipo 1 en niños y adolescentes. Instituto de Endocrinología. Cuba. 2014-2015. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 16(4), 1-12.

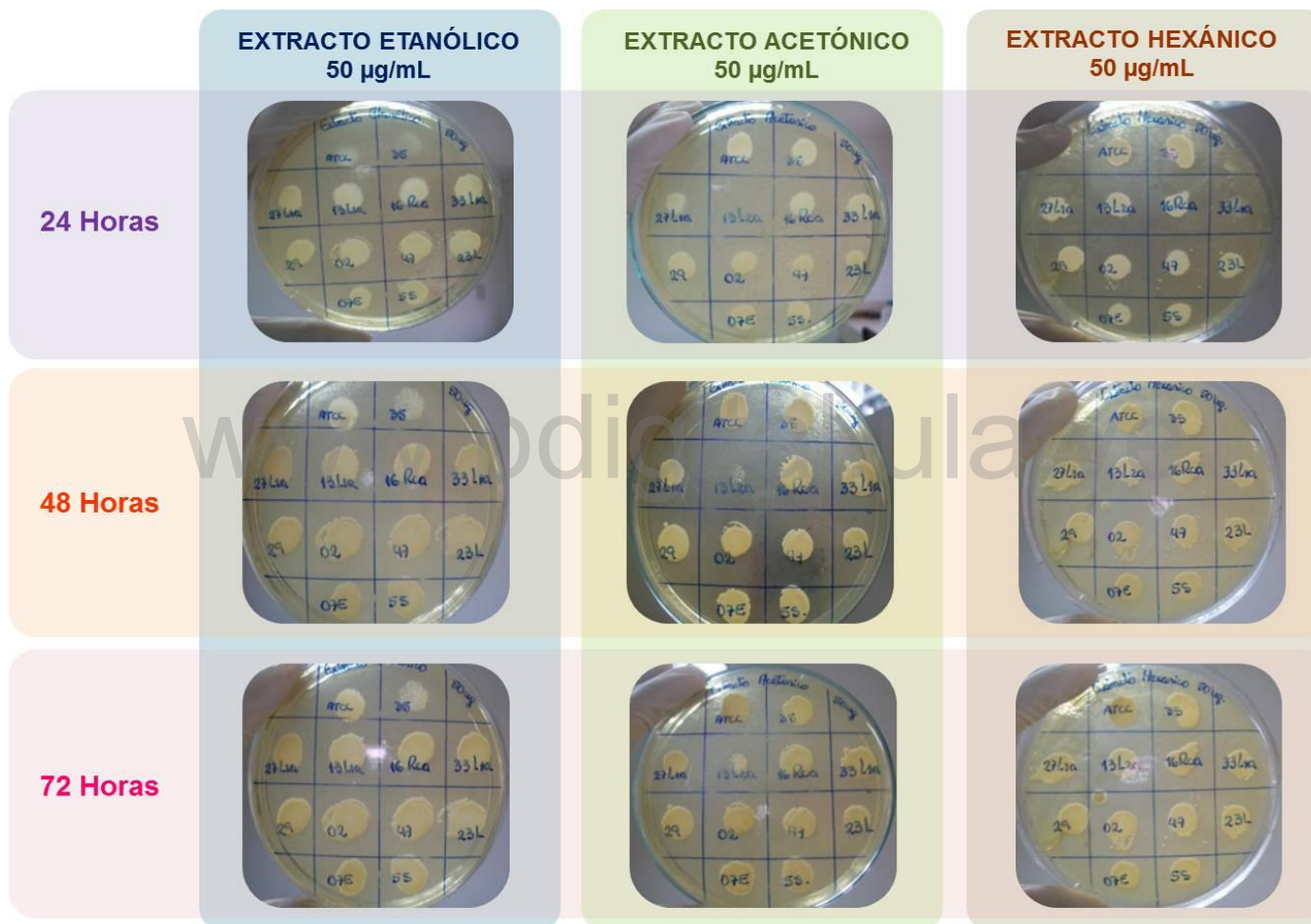


- Uribe, L., Soriano, F., Pèrez, J., & Veras, M. (2016). Acción del extracto de *Calendula officinalis* en la preservación ósea posterior a extracción. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, (56)1, 1-11.
- Vandeputte, P., Ferrari, S., & Coste, A. (2012). Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections. *International Journal of Microbiology*, 1(1), 1-26. <https://doi.org/10.1155/2012/713687>
- Vizcaya, M., Pérez, C., Rojas, J., Rojas, L., Plaza, C., Morales, A., *et al.* (2014). Composición química y evaluación de la actividad antifúngica del aceite esencial de corteza de *Vismia baccifera* var. *dealbata*. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 34(2), 86-80.
- Williams, D., & Lewis, M. (2011). Pathogenesis and Treatment of oral candidosis. *Journal of Oral Micobiology*, 3(5771), 1-11. <https://doi.org/10.3402/jom.v3i0.5771>.
- Zomorodian, K., Kavooosi, F., Pishdad, G., Mehriar, P., Ebrahimi, H., Bandegani, A., *et al.* (2016). Prevalence of oral Candida colonization in patients with diabetes mellitus. *Journal de Mycologie Médicale*, 26(2), 103-110. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2015.12.008>

www.bdigital.ula.ve



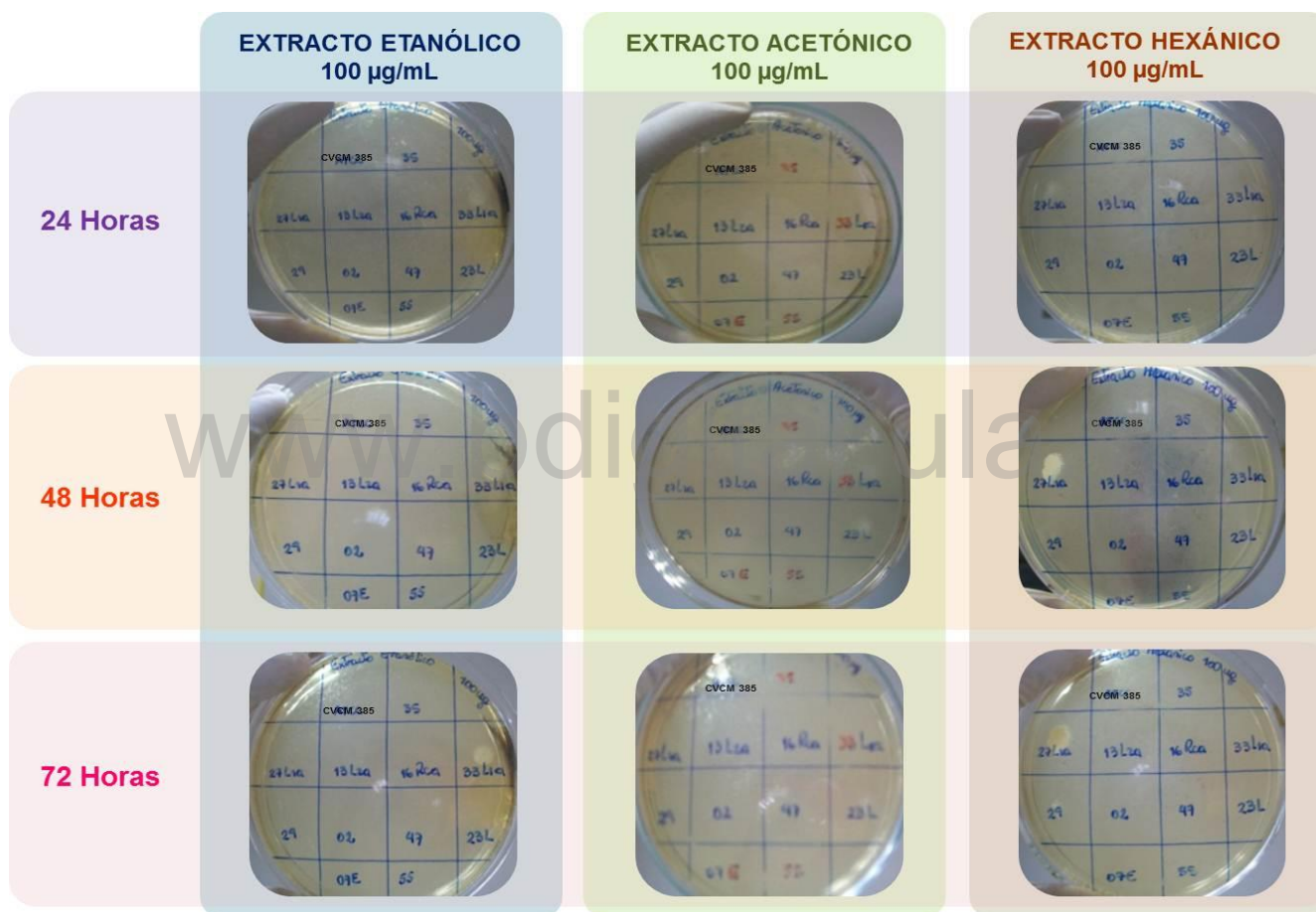
Anexo 1. Actividad antifúngica de los extractos a concentración 50 µg/mL respecto al tiempo de incubación



Fuente: Elaborada por el Autor (Resultados propios).



Anexo 2. Actividad antifúngica de los extractos a concentración 100 µg/mL respecto al tiempo de incubación



Fuente: Elaborada por el Autor (Resultados propios).

**Anexo 3.** Análisis fitoquímico de los extractos hexánico y etanólico

Compuesto	Prueba	Extracto Hexánico	Extracto Etanólico
Alcaloides	Dragendorff	Negativo	Positivo
Flavonoides	Shinoda	Positivo	Negativo
Fenoles y Taninos	Cloruro Férrico	Positivo	Negativo
Cumarinas	Hidróxido de Amonio	Positivo	Positivo
Triterpenos y Esteroides	Reacción de Lieberman Bouchard	Positivo	Positivo

Fuente: Soto & Sánchez, 2015.

www.bdigital.ula.ve

**Anexo 4.** Compuestos del extracto hexánico de flores *Calendula officinalis*

Extracto hexánico de flores de <i>Calendula officinalis</i>			
Nº pico	T. R.	% de Área	Nombre del Compuesto
1	13,24	1,05	Propano-1-nitro
2	20,82	1,41	Aromadrendeno
3	22,29	1,23	Ciclopropen azuleno
4	22,50	3,04	Ledeno
5	22,62	2,22	alfa muuroleno
6	23,04	2,11	alfa amorfeno
7	23,33	11,15	Delta cadineno
8	24,41	1,06	Ácido dodecanoico
9	25,34	1,35	Viridiflorol
10	25,39	1,55	4,5-dimetil
11	25,83	2,42	Beta oplopenona
12	25,99	0,7	Alfa Copaeno
13	26,35	1,26	Naftaleno
14	26,70	5,36	Biciclo sesquifelandreno
15	26,98	2,31	Beta eudesmol
16	27,11	13,09	T-cadinol
17	29,37	6,17	7-acetil-2-hidroxi-2 methyl
18	29,91	3,31	Ácido tetradecanoico
19	30,13	6,47	Loliolido
20	34,97	9,92	Ácido hexadecanoico
21	38,40	2,17	Fitol
22	38,86	1,68	Ácido linoleico
23	39,02	3,22	Ácido eicosatrienoico
24	53,20	1,89	Ácido carbonico
25	54,95	1,49	2-fenantrenol
26	66,63	1,41	Moretenol

Nº pico = Número de pico; **T.R.** = Tiempo de retención; **% de área** = porcentaje de área.

Fuente: Soto & Sánchez, 2015.

**Anexo 5.** Compuestos del extracto acetónico de flores *Calendula officinalis*

Extracto de acetónico de las flores de <i>Calendula officinalis</i>			
Nº pico	T. R	% de Área	Nombre del Compuesto
1	18,83	1,60	<i>Alfa</i> cubebeno
2	19,28	1,44	<i>Beta</i> cubebeno
3	21,03	1,33	Epi-bicliclo sesquifelandreno
4	21,54	3,59	PM = 204
5	21,94	1,58	Alfa amorfeno
6	22,08	1,87	Ar Curcumeno
7	22,43	1,46	PM = 204
8	22,64	2,12	<i>Alfa</i> muuroleno
9	23,08	9,62	<i>Alfa</i> amorfeno
10	23,35	9,81	<i>Delta</i> Cadineno
11	23,74	2,22	<i>Alfa</i> Cadineno
12	25,35	1,08	Viriflorol
13	26,99	1,17	Beta Eudesmol
14	29,39	5,54	<i>Oplopanona</i> *
15	29,91	1,39	Ácido tetradecanoico
16	30,07	1,10	Loliolido
17	33,37	1,10	Nonadecano
18	34,97	4,70	Ácido hexadecanoico
19	38,09	1,64	Heneicosano
20	38,40	1,15	Fitol
21	39,02	1,48	Ester metílico del ácido hexadecatrienoico
22	42,42	2,09	Nonadecano
23	46,41	2,75	Pentacosano
24	47,31	1,03	<i>Gamma</i> Selineno
25	50,14	4,30	Heptacosano
26	53,11	4,25	Nonacosano
27	54,86	4,37	PM = 283
28	54,98	3,96	PM = 303
29	56,37	2,16	Eicosano
30	62,34	1,09	<i>Beta</i> amirina
31	63,70	1,97	PM = 426
32	66,67	3,20	PM = 426

Nº pico = Número de pico; T.R. = Tiempo de retención; % de área = porcentaje de área.

Fuente: Soto & Sánchez, 2015.