



**EFFECTO INHIBIDOR DE LA MIEL DE BÓRAX SOBRE EL CRECIMIENTO DE
Candida albicans, AISLADA DE PACIENTES CON LESIONES DE ESTOMATITIS
SUBPROTESICA.**

Laura Pabón ¹, María Lugo ¹, Lorena Bustillos ², Anajulia González ², Elaysa Salas ³

- 1. Clínica Integral del Adulto III. Facultad de Odontología. Universidad de los Andes. Mérida Venezuela.**
- 2. Centro de Investigaciones Odontológicas Facultad de Odontología Universidad de los Andes. Mérida Venezuela**
- 3. Grupo de Investigaciones Biopatológicas. Facultad de Odontología. Universidad de los Andes. Mérida Venezuela**

CORRESPONDENCIA: Lorena Bustillos. Edificio Rectorado de la Universidad de Los Andes, calle 24, entre avenidas 2 y 3, Facultad de Odontología Universidad de Los Andes, Mérida Venezuela.

Email: bustillo@ula.ve

RESUMEN

En la cavidad bucal se presentan diversas patologías, una de las más frecuentes es la estomatitis subprotésica (ESP) de etiología multifactorial que afecta con alta prevalencia a



pacientes portadores de prótesis totales y frecuentemente está asociada a *Candida albicans*. La conducta terapéutica tradicional de la ESP comprende la eliminación de factores locales y el uso antifúngicos locales y sistémicos, aun cuando estos son efectivos, pueden producir efectos adversos y favorecer la generación de resistencia microbiana, en consecuencia surgen alternativas naturales como la miel de bórax, ampliamente utilizada en aftas y estomatitis herpética. El propósito de esta investigación fue comparar el efecto inhibitorio *in vitro* de 3 marcas de Miel de bórax sobre el crecimiento de 12 cepas de *Candida albicans* aisladas de pacientes con ESP y una cepa de referencia *C. albicans* CDC-385, utilizando fluconazol 100mg y clorhexidina al 0.2% como controles, mediante el método de difusión en el agar con pozos. Las placas obtenidas fueron incubadas en aerobiosis a 35 °C durante 24 horas. Se realizó la medida de los halos de inhibición en milímetros. Al comparar los resultados de las tres fórmulas oficinales de la miel de bórax se observaron diferencias significativas en los diámetros de los halos de inhibición, siendo la formula 1 quien mostro mejor efecto inhibitorio con halos mayores a 30mm, seguida de la fórmula 3 con halos de 15 a 30 mm y por último la fórmula 2 con halos menores a 15 mm. Con respecto al fluconazol se observaron halos de inhibición muy amplios en 7 de las 12 cepas estudiadas lo que indica una posible resistencia al antimicótico a estudiar. La clorhexidina al 2% inhibió el crecimiento de todas las cepas de *C. albicans* estudiadas, con halos entre 16 mm y 23 mm. Se evidencio así la actividad antifúngica *in vitro* y el beneficio potencial de la fórmula oficial de miel de bórax como alternativa viable de tratamiento en infecciones bucales asociadas a *C. albicans*.

PALABRAS CLAVE: borato de sodio, miel, *Candida albicans*, estomatitis subprotésica.



INHIBITOR EFFECT OF BORAX HONEY ON THE GROWTH OF *Candida albicans*, ISOLATED OF PATIENTS WITH LESIONS OF SUBPROTESIC STOMATITIS.

ABSTRACT

In the oral cavity, several pathologies are present, one of the most frequent is the subperitoneal stomatitis (ESP) of multifactorial etiology that affects with high prevalence of patients with total dentures and is frequently associated with *Candida albicans*. The traditional therapeutic behavior of ESP includes the elimination of local factors and the use of local and systemic antifungal agents, even when they are effective, can produce adverse effects and provoke microbial resistance, resulting in natural alternatives such as borax honey, widely used in And herpetic stomatitis. The purpose of this research was to compare the in vitro inhibitory effect of 3 brands of Borax honey on the growth of 15 strains of *Candida albicans* isolated from patients with ESP and a reference strain *C. albicans* CDC-385, Using fluconazole (Diflucan 100mg) and 0.2% chlorhexidine as controls, by means of the diffusion method in well agar. The obtained plates were incubated in areobiosis at 35 ° C for 24 hours. Measurement of inhibition halos in millimeters. When comparing the results of the three official formulations of borax honey with each other, a difference was found between the size of the inhibition halos generated by these three officinal formulas on the 13 strains evaluated, borax honey 1 generated a better inhibitory effect with Halos greater than 30mm, borax honey 3 with halos of 15 to 30mm and borax honey 2 with halos smaller than 15mm, with respect to fluconazole showed that 7 strains studied including the the reference strain CDC-385 showed antifungal resistance. Chlorhexidine 2% inhibited the growth of all strains of *C. albicans* studied, with inhibition halos ranging between 16mm and 23mm.

KEY WORDS: sodium borate, honey, *Candida albicans*, subperitoneal stomatitis.



INTRODUCCION

En la actualidad se ha incrementado el uso de medicamentos naturales en el tratamiento de diversas patologías, esta opción terapéutica surge debido a que ciertos microorganismos han desarrollado resistencia a los fármacos tradicionales y al hecho de que se piensa que los productos naturales provocan menos efectos secundarios. La homeopatía como alternativa terapéutica utiliza medicamentos naturales obtenidos a partir del reino vegetal (plantas silvestres, frutas), del animal (abejas, pulpos, hormigas) y del mineral (sílice, azufre, mercurio, plata, borato de sodio), que pueden ser administrados en gotas, glóbulos y tabletas. La acción de la homeopatía en general es antiséptica, antiinflamatoria y analgésica, por lo que se indica en la curación de procesos sépticos, dolorosos e inflamatorios, es una terapia inocua, de acción segura al no presentar reacciones adversas; también se caracteriza por ser económica, accesible y aplicable a toda persona, puede utilizarse

en trastornos agudos y crónicos (1, 2,3). En el campo odontológico, se ha comprobado su utilidad en afecciones frecuentes como: aftas bucales, hemorragias, alveolitis, hiperestesia dentinaria, odontalgias, fistulas, gingivitis, periodontitis, entre otras. En la cavidad bucal existen cerca de 300 especies de microorganismos, siendo en su gran parte de la microbiota habitual, dentro de las que se encuentra especies fúngicas oportunistas tales como levaduras del genero *Candida*, donde *Candida albicans* es la especie más asociada a la estomatitis subprotésica (ESP), patología que mantiene altos índices de incidencia representando un problema de salud en los pacientes portadores de prótesis totales, por considerarse un factor predisponente para la aparición de lesiones premalignas y malignas en la cavidad bucal, por lo que hace necesaria la búsqueda de terapias efectivas que inhiban su crecimiento. Como alternativa a los tratamientos farmacológicos tradicionales para la ESP se ha propuesto el uso de Miel de bórax, fórmula oficial, compuesta por dos



constituyentes potencialmente activos: la miel y el borato de sodio en polvo; cada 100 g contiene 79 g de miel y 1 g de borato de sodio, utilizada por décadas en el tratamiento de lesiones como aftas bucales, estomatitis herpéticas, herpes y quemaduras. Los estudios de las propiedades medicinales de la miel y el borato de sodio en el tratamiento de la estomatitis aftosa han evidenciado la desaparición de las lesiones y del dolor, logrando una rápida incorporación de los pacientes a sus actividades y mejoramiento de la calidad de vida. Sin embargo, no se cuenta con estudios que relacionen la miel de bórax al tratamiento de la ESP asociada a *C. albicans*, así como con pruebas de susceptibilidad que demuestren científicamente la efectividad antimicótica de la miel de bórax, por lo que se planteó la comparación del efecto inhibitorio de tres marcas de Miel de bórax sobre el crecimiento de 12 cepas *C. albicans* aisladas de pacientes con ESP, con la finalidad de ofrecer una terapia alternativa, accesible, y de bajo costo que beneficie

tanto al odontólogo como al paciente en el tratamiento de esta lesión.

METODOLOGIA

Se evaluaron 15 aislados clínicos obtenidos de pacientes con lesiones de ESP pertenecientes al proyecto de investigación “Aspectos Clínicos, Epidemiológicos y Microbiológicos de lesiones bucales asociadas a especies de *Candida*” del Laboratorio de Diagnóstico e Investigaciones Microbiológicas “Prof. Celina Araujo de Pérez” y una cepa de referencia de *C. albicans* CDC-385, donada por el Laboratorio de Micología “Dr. Corrado Capretti”, ambos adscritos al Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes. Previo al desarrollo de la prueba las cepas fueron descongeladas progresivamente hasta temperatura ambiente. Se inocularon 20 μ L en placas de Agar Sabouraud Dextrosa (ADS) y fueron incubadas en aerobiosis a 35 °C



durante 24 horas, por otra parte, se prepararon placas con una base delgada de ADS y se dejaron solidificar por 24 horas. Transcurrido el tiempo de incubación se verifico la pureza de las cepas mediante la observación de las características macroscópicas y microscópicas de las colonias y se subcultivo nuevamente. A partir del crecimiento obtenido se seleccionaron colonias aisladas y se resuspendieron en solución fisiológica salina estéril (SSFE) hasta alcanzar una turbidez semejante al patrón 0,5 de McFarland. Sobre las placas de ADS con base delgada, se colocaron 5 cilindros estériles de acero. En un tubo de 9 mL de ADS, fundido a una temperatura de 45 °C, se inoculo al 2% (180 µL) la suspensión previamente preparada, se mezcló hasta homogeneizar y se vertió sobre las placas con base delgada, permitiendo la solidificación. Se procedió a retirar los cilindros de acero y para obtener los pozos.

Cada pozo de los presentes en las placas fue rotulado según el código

correspondiente a cada marca de Miel de bórax a evaluar, el fluconazol y la Clorhexidina y se procedió a agregar 80 µL del producto objeto de estudio en el pozo asignado. Las placas se dejaron reposar por 30 min a temperatura ambiente, luego se incubaron sin invertir durante en aerobiosis a 35 °C por 6 horas, por último se invirtieron e incubaron en las mismas condiciones descritas hasta completar 24 horas. El efecto inhibitorio se evaluó observando la presencia o ausencia de halos de inhibición alrededor de los pozos, registrando la medida en milímetros de los halos.

RESULTADOS Y DISCUSION.

En la Figura (1) se muestra la presencia de los halos de inhibición, relacionados a ausencia de crecimiento, es decir, la susceptibilidad del aislado clínico a la fórmula utilizada. Puede observarse los diferentes diámetros obtenidos tanto para las fórmulas oficinales de miel de bórax evaluadas (pozo 2 fórmula 1, pozo 3 fórmula 2 y pozo 5 fórmula 3) como para

el fluconazol (pozo 4) y la clorhexidina (Pozo 1).

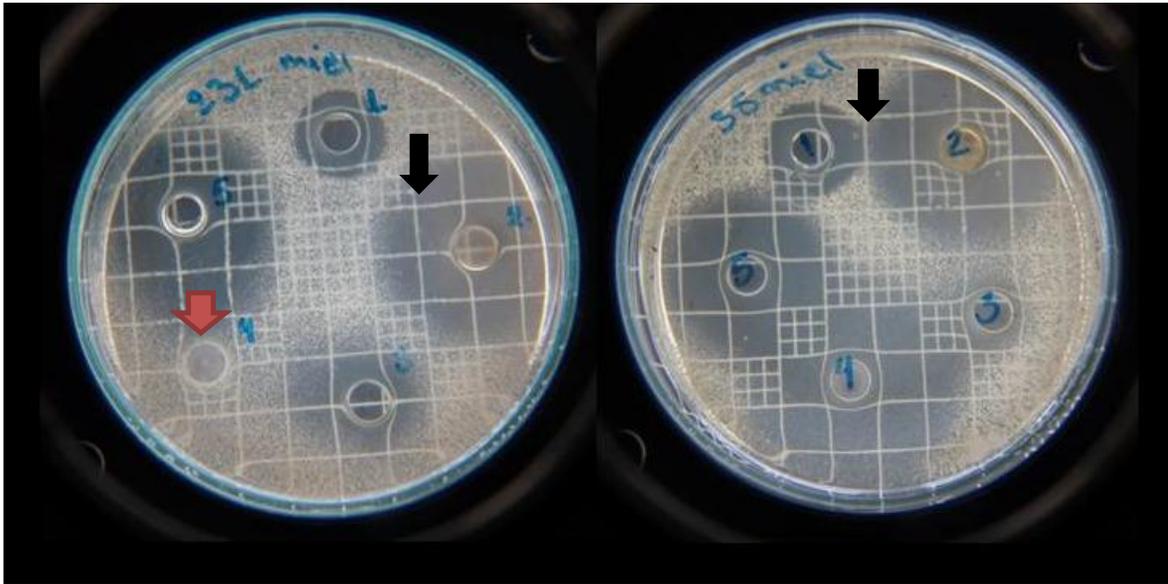


Figura 1 Halos de inhibición observados en las pruebas.

La tabla 1 muestra los resultados encontrados al evaluar el efecto inhibitorio de las tres fórmulas oficinales de Miel de bórax sobre el crecimiento de cepas de *Candida albicans*, cuyos valores de los

halos se obtuvieron por la medida del diámetro de inhibición del crecimiento de la cepa de prueba, expresados en milímetros.

Tabla 1. Efecto inhibitorio *in vitro* de tres formula oficinales de Miel de bórax sobre aislado clínicos de *C. albicans* obtenidos de pacientes con lesiones de Estomatitis Subprotésica

Cepa	Distancia del halo de Inhibición (mm)				
	Formula 1	Formula 2	Formula 3	Fluconazol 100 mg	Clorhexidina 0.12 %
2	35,0	0	30,0	49,0	16,0
13	19,5	0	14,0	0	16,5
23B	33,0	0	26,5	50,0	22,5
23L	38,5	20,0	37,0	0	18,5
26	34,5	16,5	33,5	0	16,5
27	23,0	0	30,0	0	17,5
35	38,5	14,5	32,0	41,0	18,0
43	31,5	14,0	26,0	0	16,0
46	29,0	0	20,5	45,5	20,5
47	31,0	0	25,5	47,0	20,0
53	32,5	10,0	28,5	0	16,0
54	30,5	0	22,5	44,0	23,0
CDC-385	27,5	0	18,5	0	18,5

Puede observarse que la fórmula 1 produjo en todas los aislados clínicos evaluados, halos de inhibición que oscilaron entre 19,5mm y 38,5mm con una media de

31,37; valores superiores obtenidos para la cepa de referencia CDC-385 cuyo halo de inhibición fue de 27,5 mm. Con respecto a la fórmula 2, a las 24 horas de exposición

no se evidencio inhibición del crecimiento en 7 de los aislados clínicos evaluados, ni en la cepa de referencia CDC-385; solo se observaron halos de inhibición entre 16,5 mm a 20,0 mm en solo cinco cepas clínicas de las 12 evaluadas. Para el caso de la fórmula 3, las 13 cepas evaluadas demostraron ser sensibles a esta fórmula oficial presentando halos de inhibición entre 14,0 mm y 37,0 mm con una media de 24,66 mm, valores superiores obtenidos para la cepa de referencia CDC-385 quien presento un halo de inhibición de 18,5mm. Al comparar los resultados de las tres fórmulas oficiales de la miel de bórax se puede deducir que la fórmula 1 presentó los halos de inhibición más amplios

seguida de la fórmula 3 y por último la fórmula 2 quien solo inhibió el crecimiento de 5 aislados clínicos. entre sí, se encontró una diferencia entre el tamaño de los halos de inhibición generados por estas tres fórmulas oficiales sobre las 13 cepas evaluadas, dado que dos de las tres fórmulas de la miel de bórax estudiadas demostraron tener efecto inhibitorio sobre las 13 cepas evaluadas, mientras que una fórmula oficial solo inhibió el crecimiento de 5 cepas. Como se aprecia en la Figura 2, la miel de bórax 1 genero mejor efecto inhibitorio con halos mayores a 30mm, seguida por miel de bórax 3 con halos de 15 a 30mm y miel de bórax 2 con halos menores a 15mm.

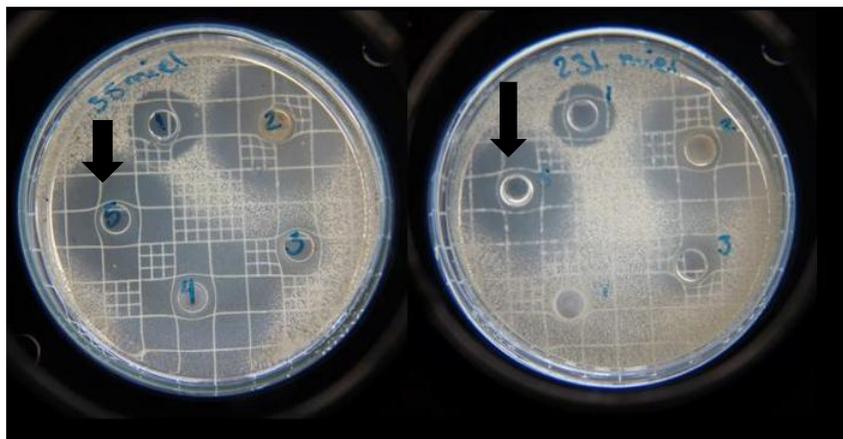


Figura 2. Halos de inhibición observados en las pruebas

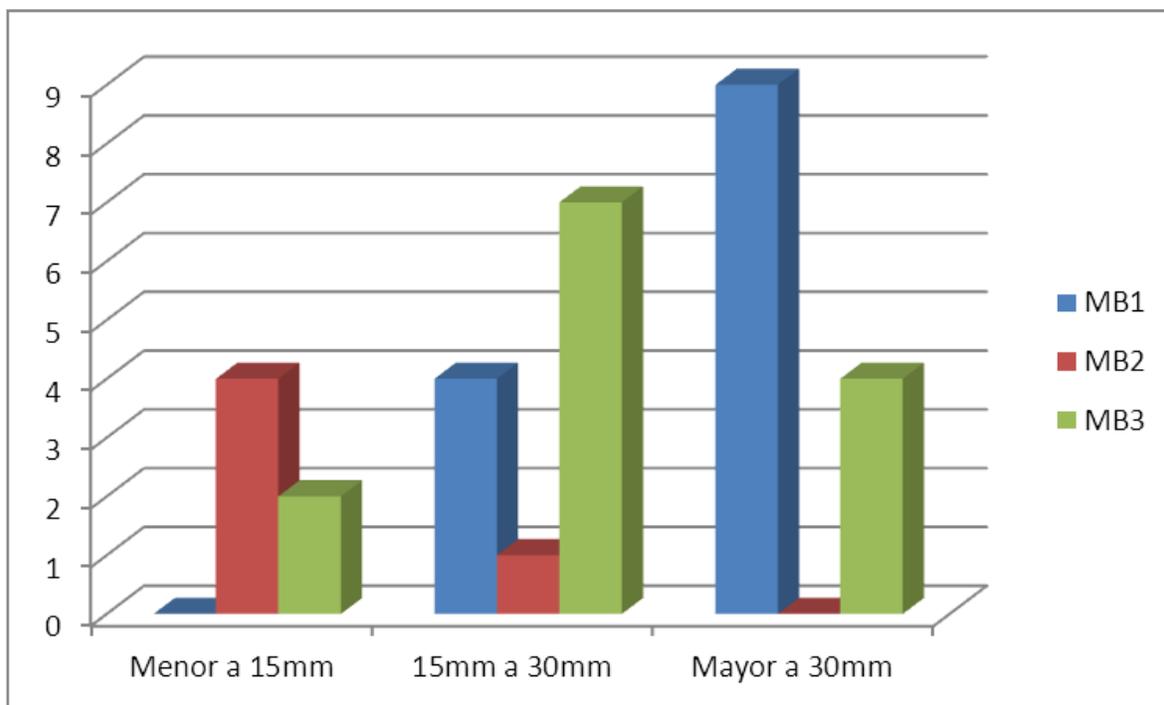


Figura 3. Comparación de los halos de inhibición de las tres fórmulas oficinales de la miel de bórax.

Basado en los resultados obtenidos se determinó mediante el método de difusión en agar, que las fórmulas oficinales de la miel de bórax poseen acción antifúngica sobre el crecimiento de *C. albicans*. Sin embargo, es importante destacar que, a pesar de que las fórmulas oficinales evaluadas declaran en su etiqueta que

contienen las mismas concentraciones de sus componentes (miel y borato de sodio) descritas en la farmacopea venezolana, los resultados indican que existen diferencias en sus potencialidades lo que puede relacionarse a la calidad de la materia prima o diferencias en los excipientes o aditivos que utilizan los laboratorios, los



cuales podrían potenciar o no, el efecto antimicótico. Diferentes investigaciones *in vitro*, han reportado el efecto inhibitorio de los componentes de la miel de bórax. Irish y cols en 2006 demostraron que ciertas mieles poseen actividad antifúngica frente a tres especies de *Candida*, entre esas *C. albicans* obtenidas de aislados clínicos (2, 3). Por otra parte, Kuncic y cols en 2012 aportan que la miel tiene actividad antibacteriana con concentraciones entre 1-50% frente a cuatro especies de bacterias, sin embargo estos autores también reportaron que algunas levaduras como *C. albicans* no fueron susceptibles a los tipos de miel analizadas ni usando la concentración más alta, encontrando diferencia con la presente investigación ya que la miel de bórax contiene 79gr de miel y genero efecto inhibitorio ante las cepas evaluadas (4) respecto al método de susceptibilidad aplicado. Existen reportes que hacen referencia a las propiedades antimicrobianas de la miel y su mecanismo de acción inhibitoria, en el 2014 Israili, le atribuye a la miel: el grado de acidez (pH bajo), efecto osmótico, alta concentración

de azúcar, presencia de factores bacteriostáticos y bactericidas representados por el peróxido de hidrógeno, antioxidantes, lisozima, polifenoles, ácidos fenólicos, flavonoides, metilglioxal, y péptidos de abeja (6). Simultáneamente Canonico y cols mediante citometría de flujo y microscopía electrónica de barrido indicaron que la miel puede inhibir el crecimiento de los fenotipos exhibidos por *C. albicans* y reducir la infección modificando el proceso de ramificación asociado con la formación de hifas relacionado con su patrón de virulencia, induciendo cambios en la integridad de membrana de *C. albicans* (7). De Seta y cols en el 2009, utilizaron el método de difusión en agar y demostraron que el ácido bórico, es fungistático a bajas concentraciones y fungicida en altas concentraciones, a su vez compararon sus resultados con el borato de sodio, el cual generó menor efecto inhibitorio, atribuyendo que el ácido bórico como derivado del bórax tiene la capacidad de disminuir el ergosterol celular de *C. albicans*



interfiriendo en el desarrollo y transformación de las hifas (5). Con respecto al Efecto inhibitorio del fluconazol sobre el crecimiento de cepas de *Candida albicans*, se determinó que hubo inhibición de crecimiento en 6 cepas de las 13 evaluadas, con halos de inhibición mayores a 40mm y algunas de estas presentaron crecimiento selectivo, así como también se evidenció que 7 cepas estudiadas incluyendo la cepa de referencia CDC-385 presentaron resistencia al antimicótico. (Tabla 1). Aunque la literatura ha descrito el fluconazol como un triazol, con excelentes propiedades farmacocinéticas y como la terapia antifúngica de elección ante *C. albicans*, en esta investigación se evidencia que las cepas de este microorganismo han desarrollado un Comportamiento atípico ante el efecto antifúngico de este fármaco. En vista de estos resultados podemos sugerir que existe un comportamiento atípico por parte de *C. albicans* ante el efecto inhibitorio del fluconazol, sin embargo debe señalarse que la baja susceptibilidad observada por

las levaduras puede deberse a que el paciente Ha recibido un tratamiento prolongado con fluconazol, esto concuerda con Bedout y cols en el 2003, quienes indican que el 88,1% de las cepas de *C. albicans* aisladas y estudiadas fueron susceptibles al fluconazol y el 11,9% restante presentó resistencia al fármaco, atribuyendo que dicha resistencia puede deberse a que las levaduras ya han sido expuestas al fármaco mediante un tratamiento previo con derivados azólicos (8). En este caso es importante resaltar que en la presente investigación se evidenció la resistencia que presentan las cepas de *C. albicans* derivadas de aislados clínicos ante el fluconazol. Carrillo y cols en 1997, aportan que un 95% de las cepas usadas en su estudio fueron sensibles al fluconazol, encontrando 10 cepas resistentes (9); lo cual es similar a los resultados obtenidos en la presente investigación, donde 7 cepas demostraron no ser sensibles al fluconazol. Con respecto al efecto inhibitorio del control positivo se observó que la clorhexidina al 2% inhibió el crecimiento de todas las cepas de *C. albicans*



estudiadas, con halos de inhibición comprendidos entre 16mm y 23mm (tabla 1). El estudio *in vitro* realizado por Ucar y cols en el 2007, corroboran los resultados de esta investigación dado que en su estudio se demostró la efectividad fungicida de la clorhexidina al 2% sobre *C.albicans* como solución limpiadora de las prótesis, ya que es efectiva a la Cepa 47 inhibe el crecimiento de este microorganismo a partir de los cinco minutos de inmersión (10). Al compararlo con la actividad inhibitoria que demostraron las fórmulas oficinales de la miel de bórax sobre la inhibición del crecimiento de *C.albicans*, se observa que estas fórmulas oficinales generaron un excelente efecto al inhibir el crecimiento *in vitro* de *C. albicans*, como también fueron efectivas en los casos que el fluconazol no generó ningún efecto inhibitorio, encontrando similitud en la investigación reportada por Mulu y cols en el 2010, quienes aplicaron la misma técnica de susceptibilidad antifungica para evaluar el efecto de la miel sobre especies

de *Candida*, aisladas de pacientes con SIDA y en sus hallazgos coinciden que las cepas de *Candida* no fueron totalmente susceptibles ante el fluconazol, demostrando que la miel tiene una concentración mínima fungicida de 35-40% y fue efectiva en la inhibición de crecimiento de las cepas que demostraron resistencia al Fluconazol (11). En las infecciones de la cavidad bucal, *C. albicans* juega un papel cada vez más importante debido a la resistencia que ha demostrado tener a los tratamientos antimicóticos tradicionales, lo cual ha ejercido influencia sobre la investigación y el desarrollo de nuevos y variados fármacos, que garanticen un tratamiento eficaz.

REFERENCIAS

1. Ley L, Silva Y, Martin O, Paz E, Landrian. Eficacia del aceite de girasol ozonizado en el tratamiento de la estomatitis subprótesis grado I y II. Rev Arch Méd Camagüey. 2008;12(3):1–9.



2. Seta F, Schmidt M, Vu B, Essmann M, Larsen B. Antifungal mechanisms supporting boric acid therapy of *Candida* vaginitis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2009; 6:, 325–336. Disponible en:

<http://jac.oxfordjournals.org/content/63/2/325.short>.

3. Irish J, Carter D, Shokohi T, Blair S. Honey has an antifungal effect against *Candida* species. *Medical Mycology*. 2006; 44: 289-291.

4. Kuncic M, Jaklic D, Lapanje A, Gunde N. Antibacterial and antimycotic activities of Slovenian honeys. *Br J Biomed Sci*. 2012;69(4):154-8.

Disponibles en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23304790>

5. Seta F, Schmidt M, Vu B, Essmann M, Larsen B. Antifungal mechanisms supporting boric acid therapy of *Candida* vaginitis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2009; 6:, 325–336. Disponible en:

<http://jac.oxfordjournals.org/content/63/2/325.short>.

6. Seta F, Schmidt M, Vu B, Essmann M, Larsen B. Antifungal mechanisms supporting boric acid therapy of *Candida* vaginitis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2009; 6:, 325–336. Disponible en:

<http://jac.oxfordjournals.org/content/63/2/325.short>

7. Cononico B, Vandıracci M, Citterio B, Curci R, Squarzony S, Mazzoni A, Papa S, Piatti E. Honey flavonoids inhibit *Candida albicans* morphogenesis by affecting DNA behavior and mitochondrial function. *Future Microbiol*. 2014; 9(4):445-56.

Disponible en:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24810344>

8. Bedout C, Ayabaca J, Vega R, Méndez M, Santiago A, Pabón M, Tabares A, Arango M, Restrepo A, Newell V. Evaluación de la susceptibilidad de especies de *Candida* al fluconazol por el método de



difusión de disco. Biomédica. 2003; 23(1): 31-7. Disponible en:

<http://www.revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/1195/1310>.

9. Carrillo A, Tur C, Estivill D, Montsant L, Carceller A, Hernández J, Torres

J. Resistencia in vitro al fluconazol e itraconazol en aislamientos clínicos de *Candida spp* y *Cryptococcus neoformans*. Rev Iberoam Micol. 1997;

14: 50-54. Disponible en: <http://www.reviberoammicol.com/1997-14/050054.pdf>.

10. Ucar A, Rojas G, Ballester A. Acción de agentes químicos en la eliminación de *Candida albicans* sobre prótesis dentales. Acta Odontológica Venezuela. 2007; 45(2):172.

11. Mulu A; Diro E, Tekeleslassie H, Belyhun Y, Anagalu B, Alemayehu M, Gelaw A, Biadlegne F, Desdegn K, Yifiru S, Tiruneh M, Kassu

A, Nishikawa T, Isosai E. Effect of Ethiopian multiflora honey on

fluconazole-resistant *Candida* species isolated from the oral cavity of

AIDS patients. Int J STD AIDS. 2010;21(11):741-5. Disponible en:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21187354>