



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE BIOPATOLOGÍA.

**EFECTO ANTIMICROBIANO DE MEMBRANAS
DE QUITOSANO/PROPÓLEO SOBRE BACTERIAS PATÓGENAS DE
INTERÉS ODONTOLÓGICO**

Trabajo Especial de Grado para optar al título de Odontólogo

www.bdigital.ula.ve

Autores:

Br. Cedillo Medina Isbel Alejandra.

Br. Fernández Becerra Yaneth del Valle.

Tutor: Farm. Salas Osorio Elaysa PhD.

Cotutor: Lic. González Betancourt Anajulia MSc.

Mérida – Venezuela,

Junio 2021

AGRADECIMIENTOS

A nuestra tutora y querida profesora Farm. Elaysa Salas Osorio PhD, por su tiempo, dedicación y optimismo, aptitudes características de su persona, las cuales fueron clave para el logro de éste proyecto. Asimismo a nuestra Cotutora, Lic. Anajulia González Betancourt MSc por su valioso aporte intelectual en la realización de nuestro trabajo.

Al Profesor y además padrino de promoción Damian Cloquell, ejemplo de la cátedra y pedagogía de un docente, por su disposición y colaboración en la elaboración de ésta investigación.

Profesora Yinec Varela, por sus aportes teóricos, importantes en el desarrollo del trabajo.

A ProBioVital Laboratorios, por permitirnos su sede y equipos para el desarrollo experimental de nuestra investigación.

A nuestras familias por su ser un apoyo emocional constante que nos mantuvo enfocadas en el objetivo propuesto, por intervenir directa o indirectamente en el proceso hasta alcanzar nuestra meta.

Finalmente a la Universidad de Los Andes, *Alma Máter* llena de formadores y personas que de una manera u otra nos han formado como futuros profesionales y seres humanos, permitiéndonos llegar hasta el nivel en que hoy nos encontramos.

ÍNDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	3
ÍNDICE DE CONTENIDO	4
ÍNDICE DE GRÁFICAS	8
ÍNDICE DE TABLAS	9
RESUMEN	10
INTRODUCCIÓN	11
CAPÍTULO I	13
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	13
1.1 Definición y contextualización del problema	13
1.2 Objetivos de la investigación	16
1.2.1 Objetivo general	16
1.2.2 Objetivos específicos	16
1.3 Justificación	16
CAPÍTULO II	18
MARCO TEÓRICO	18
1.4 Antecedentes:	18
1.4.1 Actividad antimicrobiana del quitosano/propóleo sobre <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	18
1.4.1.1 Gel:	18
1.4.1.2 Nanopartículas:	19
1.4.2 Actividad antimicrobiana del quitosano/propóleo sobre otras bacterias:	20
1.4.3 Actividad antimicrobiana del propóleo sobre <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	22
1.4.4 Actividad antimicrobiana del quitosano sobre <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	24

1.4.5	Actividad antimicrobiana del quitosano junto a otros componentes sobre las bacterias en estudio:	26
1.5	Bases conceptuales	27
1.5.1	Microbiología de la cavidad bucal:	27
1.5.2	Antimicrobianos	30
1.5.2.1	Resistencia antimicrobiana	30
1.5.2.2	Método de prueba de susceptibilidad antimicrobiana.	30
1.5.3	Gluconato de Clorhexidina	32
1.5.3.1	Historia de la Clorhexidina	32
1.5.3.2	Mecanismo de acción	32
1.5.3.3	Usos clínicos	32
1.5.3.4	Efectos adversos	33
1.5.4	Productos naturales de uso odontológico con capacidad antimicrobiana	33
1.5.5	Propóleo	33
1.5.5.1	Historia	33
1.5.5.2	Composición química	34
1.5.5.3	Propiedades biológicas	35
1.5.5.4	Acción antimicrobiana	35
1.5.5.5	Reacciones adversas	35
1.5.5.6	Usos en Odontología	36
1.5.6	Quitosano	36
1.5.6.1	Historia	36
1.5.6.2	Composición química	37
1.5.6.3	Propiedades biológicas	37
1.5.6.4	Acción antimicrobiana	38
1.5.6.5	Reacciones adversas	38
1.5.6.6	Usos en Odontología.	39

1.5.7	Membranas de quitosano.	39
CAPÍTULO III		41
MARCO METODOLÓGICO		41
1.6	Alcance y diseño de investigación	41
1.7	Población y muestra	41
1.7.1	Muestra Biológica.	41
1.8	Sistemas de variables	41
1.8.1	Fase I.	42
1.8.2	Fase II.	42
1.8.3	Fase III.	42
1.9	Técnicas e instrumentos de recolección de datos	43
1.9.1	Validación del instrumento	43
1.10	Procedimientos, materiales e instrumentos.	44
1.10.1	Materiales:	44
1.10.2	Procedimientos.	44
1.11	Principios éticos.	54
1.12	Plan de análisis de resultados.	54
CAPÍTULO IV		56
RESULTADOS		56
1.13	Fase I. Prueba de susceptibilidad microbiana.	56
1.14	Fase II: Prueba para determinar la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) del extracto etanólico de propóleo.	61
1.15	Fase III: Prueba de susceptibilidad microbiana ante una membrana de quitosano/propóleo.	62
CAPÍTULO V		64
DISCUSIÓN		64
CAPÍTULO VI		69

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	69
1.16 Conclusiones	69
1.17 Recomendaciones	69
REFERENCIAS	71
APÉNDICE A	88

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1 Prueba de susceptibilidad del extracto de propóleo sobre *S. aureus*. 45

Gráfica 2 Prueba de susceptibilidad del extracto de propóleo sobre *E. faecalis*. 46

Gráfica 3 Prueba de susceptibilidad del extracto de propóleo sobre *P. aeruginosa*.

47

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Materiales para proceso experimental	33
Tabla 2 Fórmula para la preparación de las membranas de Quitosano/Propóleo Q/P.	41
Tabla 3 Prueba de sensibilidad de la tintura de propóleo en los microorganismos evaluados.	44
Tabla 4 Patrón de susceptibilidad de las bacterias evaluadas en función de la concentración de la Tintura de propóleo al 45%.	49

www.bdigital.ula.ve



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE BIOPATOLOGÍA.

**EFFECTO ANTIMICROBIANO DE MEMBRANAS
DE QUITOSANO/PROPÓLEO SOBRE BACTERIAS DE INTERÉS
ODONTOLÓGICO**

Trabajo Especial de Grado para optar al título de Odontólogo.

Autores: Br. Cedillo Medina Isbel Alejandra.

Br. Fernández Becerra Yaneth del Valle.

Tutor: Farm. Salas Osorio Elaysa PhD.

Cotutor: MSc. González Betancourt Anajulia.

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: El área de la salud se ha mantenido en la exploración de nuevas opciones para el control de microorganismos patógenos, los productos naturales representan una gran alternativa. Actualmente el quitosano y propóleo son ampliamente utilizados en Odontología, obteniendo resultados favorables. **OBJETIVO:** Establecer la concentración ideal de la tintura propóleo al 45% (TP) presente en una membrana de quitosano que garantice un efecto antibacteriano sobre patógenos de interés odontológico. **METODOLOGÍA:** Investigación de tipo explicativo y diseño experimental en un contexto de laboratorio, se determinó la actividad antibacteriana de TP al 45% sobre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 por la técnica de difusión en agar modificada con pozos, se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) utilizando la técnica de macrodilución en tubos. Se elaboraron las membranas de quitosano/propóleo con la CIM obtenida. El efecto antimicrobiano se evaluó mediante método de difusión en agar. Todas las evaluaciones se realizaron por triplicado, utilizando como grupo control gluconato de clorhexidina al 0,12%. Los datos se reflejaron de acuerdo a las diferentes fases del experimento en gráficos de barra y tablas simples, también fueron procesados a través de la prueba estadística “T de Student” **RESULTADOS:** Fase I, *S. aureus* fue más susceptible que *E. faecalis*. Fase II, CIM de TP para *S. aureus* 16 ug/mL, *E. faecalis* 128 ug/mL. Fase III, no hubo actividad antibacteriana dada por las membranas. **CONCLUSIÓN:** TP mostró actividad ante dos de las bacterias, las membranas de quitosano/propóleo no presentaron inhibición sobre las cepas.

Palabras clave: quitosano, propóleo, actividad antimicrobiana, bacterias odontopatógenas.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad el área de la salud se mantiene en la búsqueda de nuevas opciones para el manejo y control de microorganismos patógenos, dónde el uso de productos de origen natural es una de las de mayor auge. Los microorganismos, al igual que todo ser vivo, tienen capacidad adaptativa; y debido a esto han logrado presentar resistencia ante algunos antimicrobianos; además de los efectos adversos que algunas de estas sustancias sintéticas tienen sobre el cuerpo humano.

El quitosano y propóleo son dos productos de origen natural que están siendo ampliamente usadas en Odontología bajo diferentes presentaciones y especialidades, obteniendo resultados favorables en: tratamientos endodónticos, cirugías, restauraciones y problemas periodontales. La ventaja del empleo de sustancias naturales, posiblemente se deba a su accesibilidad, bajo costo y poca posibilidad de presentar efectos adversos.

Las evidencias halladas sugieren que el quitosano y el propóleo son potentes antimicrobianos, sin embargo, la acción antimicrobiana de ambas sustancias dentro de una membrana viable no ha sido estudiada; es por ello, que ésta investigación se enfocará en determinar de forma *in vitro* la actividad antimicrobiana de una membrana de quitosano y propóleo sobre los patógenos de interés odontológico *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Asimismo se realizará la comparación de dicha acción con gluconato de Clorhexina al 0,12%, el antimicrobiano de elección en Odontología.

La presente investigación tendrá un alcance de tipo explicativo y un diseño experimental en un contexto de laboratorio y estará estructurado de la siguiente manera:

- Capítulo I:
 - Planteamiento del problema
 - Objetivos de la investigación

- Justificación
- Capítulo II:
 - Antecedentes
 - Bases teóricas
- Capítulo III:
 - Nivel y diseño de investigación
 - Población
 - Muestra
 - Sistemas de variables
 - Técnicas e instrumentos de recolección de datos
 - Procedimientos, materiales, equipos e instrumentos
 - Principios bioéticos
 - Análisis de resultados.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO I

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1 Definición y contextualización del problema

La cavidad bucal es considerada un ecosistema microbiano¹, ya que alberga innumerables bacterias que forman la microbiota bucal y tienen capacidad odontopatógena², las más comunes son: *Streptococos* del grupo *mutans*²⁻⁴, *Lactobacillus*⁵, *Actinomyces*⁵, *Porphyromonas gingivalis*³⁻⁵, *Prevotella intermedia*⁴, *Tannerella forsythia*³, *Treponema denticola*⁴, *Fusobacterium nucleatum*⁵ y *Staphylococcus aureus*⁶, que pueden ser causantes de diferentes enfermedades bucales⁷. Además de la microbiota bucal antes mencionada, existen otras bacterias exógenas, que no producen afección típica bucal, pero pueden causar sobreinfecciones, donde se aíslan enterobacterias como *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*; dichos microorganismos exógenos tienen gran importancia debido a la gran cantidad de factores de virulencia y por ser patógenos en otros sitios orgánicos, pudiendo dificultar el tratamiento de distintas afecciones⁸.

Para la prevención, manejo y control de infecciones bucales en odontología, se ha usado la clorhexidina⁹⁻¹¹, la cual es reportada en la literatura como el antiséptico bucal de elección^{10,12-15}. No obstante ha demostrado efectos adversos al emplearla por tiempo prolongado y algunos efectos tóxicos¹⁶, de ellos destacan: la tinción en dientes, tejidos blandos y restauraciones, además de alterar el sabor, generar sensación de ardor e irritación de la mucosa y tumefacción parotídea¹⁷. En el área de la salud se ha buscado hacer uso de productos naturales^{18,19}, a causa del incremento de la resistencia a los antibióticos, efectos secundarios que generan algunos antimicrobianos, mayor disponibilidad que ofrecen los productos naturales y sus menores costos²⁰. De allí destaca el uso de tratamientos apícolas llamados

“apiterapia”, siendo el propóleo uno de los más conocidos²¹. El propóleo es un polímero resinoso natural producido por las abejas^{2,18,21-23} a partir de las plantas^{16,21-23} y exudados de las cortezas de los árboles^{21,24-26}, ésta resina lipofílica es pegajosa y flexible al exponerse al calor, o dura y quebrantable a bajas temperaturas¹⁸.

En sus propiedades, el propóleo destaca como agente antioxidante²²⁻²⁷, antitumoral^{22,24}, antimicrobiano^{2,22,23,25,27}, antiinflamatorio^{2,18,22,23,25,26}, antifúngico^{18,22,24,26}, anticancerígeno y antiviral^{2,18,21,22,24,26} así como se ha encontrado actividad antibacteriana^{2,18,22,25,26} sobre diversos microorganismos, donde algunos de ellos han expuesto ser resistentes a los antibióticos²⁴. Cabe destacar que el propóleo al poseer múltiples actividades biológicas y ser una fuente de polifenoles, tiene alto potencial para ser utilizado como un agente activo que se puede incorporar en películas²⁵.

En odontología se le han adjudicado múltiples usos con resultados beneficiosos donde se destacan el efecto antibiopelícula^{18,22}, desinfectante¹⁸ y sellador endodóntico²¹, desinfectante cavitario, agente preventivo de la hipersensibilidad dentaria^{18,21,23}, material restaurativo, efecto cariostático^{18,23}, antiinflamatorio, coadyuvante en el tratamiento de la enfermedad periodontal^{18,21,22}, preservante de la vitalidad de células periodontales en dientes avulsionados^{22,23}, inductor de la regeneración tisular periodontal²¹ y reparación de la mucosa bucal ulcerada^{18,21,22}.

Por otro lado, el quitosano, es derivado de la desacetilación de la quitina^{21,23,28-33}, la cual se conoce como el segundo polisacárido más abundante del planeta^{30,33} y cuya fuente de obtención principal son los exoesqueletos de los crustáceos^{21,28-32} como el cangrejo^{28,29} y camarón^{28,29,33}, algunos insectos²⁹⁻³¹, hongos²⁸⁻³⁰ y plantas²⁸⁻³⁰. El quitosano es considerado un polisacárido con una inmensa cantidad de beneficios, donde se puede resaltar el ser biocompatible^{23,28,30-32,34}, biodegradable^{23,28,30,31}, bioadhesivo^{23,30}, no tóxico^{23,30,32,34} y además de bajo costo^{26,31-34}, con múltiples propiedades donde se destaca como agente antibacteriano¹³. Debido a esto, lo convierte en un agente ideal para aplicaciones tópicas y sistémicas en la medicina y farmacología, para el tratamiento de infecciones causadas por microorganismos³⁵. La actividad antimicrobiana del quitosano posee un espectro contra bacterias Gram

negativas, Gram positivas y hongos³²; la cualidad más noble radica en su estructura molecular, ya que posee grupos funcionales reactivos que permiten realizar diferentes uniones electroquímicas a nivel celular y molecular; por esto se convierte en un vehículo ideal para diversos fármacos^{29,32-34}.

En odontología el quitosano genera interés, pues ha demostrado su actividad antimicrobiana al cubrir superficies con dicho biomaterial y protegerlas contra infecciones; específicamente se ha comprobado que las superficies recubiertas con quitosano resisten la biopelícula de *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida albicans*²⁵. Además se ha empleado en diferentes formas como membranas, hidrogeles, gelatinas, entre otras^{30,32} y en distintas disciplinas, tales como, endodoncia para el tratamiento e irrigación del canal radicular^{21,32}, periodoncia^{21,30} y cirugía en la restitución de tejidos duros y blandos perdidos²¹, regeneración ósea guiada³⁰ y para cubrir defectos óseos causados por diversas etiologías^{21,26,30,32}.

Investigadores han planteado el uso de quitosano como vehículo de otras sustancias^{2,20,26,36}, en este caso el propóleo, demostrando que es posible la unión entre ambos biomateriales debido a sus interacciones químicas¹⁶. Es por ello que se ha estudiado la acción antimicrobiana del propóleo y el quitosano, al combinarlos en diferentes presentaciones para su posible aplicación en las especialidades de la odontología, tales como: operatoria dental al evaluar un barniz y gel adhesivo de quitosano/propóleo con posible efecto anticariógeno^{22,36}, en endodoncia al estudiar un gel de quitosano/propóleo como posible irrigante y medicamento intraconducto³⁷.

Se ha estudiado el papel del propóleo en nanopartículas con quitosano para evaluar sus propiedades antimicrobianas y anti-biopelícula contra *E. faecalis*; los resultados de este estudio revelaron que la nanoformulación de quitosano-propóleo puede considerarse como un potencial agente anti-biopelícula para resistir infecciones que involucran la formación de biopelícula en heridas crónicas e infecciones del sitio quirúrgico³⁵. Sin embargo, no se han hallado estudios donde evalúen la actividad antimicrobiana *in vitro* al combinar propóleo en membranas de quitosano contra bacterias odontopatógenas, de allí surge la siguiente interrogante ¿qué actividad

antimicrobiana poseen estos dos productos al utilizarse en forma de membrana contra bacterias odontopatógenas?

1.2 Objetivos de la investigación

1.2.1 Objetivo general

Establecer la concentración de propóleo presente en una membrana de quitosano que garantice un efecto antibacteriano sobre patógenos de interés odontológico (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853)

1.2.2 Objetivos específicos

- Determinar la actividad antimicrobiana de la tintura de propóleo al 45% contra *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Pseudomonas aeruginosa*.
- Determinar la actividad antimicrobiana del gel de quitosano contra *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Pseudomonas aeruginosa*.
- Determinar la Concentración mínima inhibitoria (CIM) de la tintura de propóleo al 45% sobre *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Pseudomonas aeruginosa*.
- Analizar la actividad antimicrobiana de membranas de quitosano/propóleo contra *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Pseudomonas aeruginosa* utilizando como control positivo gluconato de clorhexidina al 0,12%.

1.3 Justificación

Por lo anteriormente expuesto se plantea que:

- De acuerdo con la aparición de especies patógenas con alta resistencia hacia numerosos fármacos, biodisponibilidad insuficiente y posibles efectos secundarios del antiséptico de elección, es de gran relevancia la búsqueda de

alternativas que sean de fácil acceso, que reduzcan el uso de antibióticos para así evitar el aumento de resistencia bacteriana y que produzcan la menor cantidad de efectos adversos, sin disminuir su efectividad antiséptica, tales podrían ser los biomateriales, como: el propóleo y el quitosano.

- Agregando a lo anterior, no se encontraron estudios en odontología acerca de la combinación del propóleo en membranas de quitosano y sus efectos antimicrobianos sobre bacterias de interés odontológico, es por esto que se decidió evaluar la capacidad antimicrobiana al unir estos biomateriales en una membrana para su estudio *in vitro*.
- El estudio del efecto antimicrobiano de las membranas de propóleo/quitosano sobre bacterias odontopatógenas, es un punto de partida para futuras investigaciones y su aplicación en el ámbito clínico odontológico.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

1.4 Antecedentes:

En este capítulo, se consideran aspectos teóricos fundamentales del estudio. De esta manera se incluyeron estudios previos que poseen relación con la presente investigación. A continuación, se citaron algunas investigaciones tanto nacionales como internacionales, expuestas en orden temático y cronológico de las más antiguas a las más recientes.

1.4.1 Actividad antimicrobiana del quitosano/propóleo sobre *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Pseudomonas aeruginosa*.

1.4.1.1 Gel:

Luaces³⁷ en 2017 en la Universidad de Cuenca, realizó un estudio comparativo de la actividad antimicrobiana de un gel de propóleo con quitosano e hidróxido de calcio sobre *E. faecalis*. El gel de quitosano con propóleo se obtuvo al mezclar 4 mL de ácido acético al 1% con quitosano en polvo, más 1 mL de extracto de propóleo al 30% al cual se le realizó una agitación a 500 rpm durante 10 minutos. Se procedió a la inoculación de las bacterias pasando un aplicador con inóculo tres veces seguidas en la superficie del agar Müller-Hinton. Posteriormente, se colocaron discos embebidos con clorhexidina en gel al 2%, ampicilina, hidróxido de calcio y agua destilada, el gel de quitosano y quitosano/propóleo, se agregaron directamente sobre el agar por medio de pocillos de 6mm. En la medición de los halos de inhibición, la ampicilina (control positivo) presentó halos inhibitorios mayores con 31 – 40 mm, siguiendo luego el gel de quitosano-propóleo el cual produjo halos de 21 – 30 mm, el Calcifar-P (hidróxido de calcio) y clorhexidina presentaron halos de 11 – 20 mm. El

gel de quitosano produjo en el 100% de casos, halos de 11 – 20 mm. El autor concluyó que el gel de quitosano/propóleo obtuvo el halo inhibitorio más alto, lo cual denota su potente actividad antimicrobiana *in vitro* sobre el *E. faecalis*, sugiriendo que podría ser una buena alternativa para ser empleado como medicación intraconducto.

1.4.1.2 Nanopartículas:

Ong et al.³⁵ 2017 en Malasia, estudiaron el rol del propóleo desarrollado en nanopartículas de quitosano por sus propiedades antimicrobianas y anti biopelícula contra *E. faecalis*. Se añadió extracto etanólico de propóleo a las nanopartículas de quitosano para crear 6 formulaciones de nanopartículas de propóleo y quitosano con diferentes concentraciones de propóleo; en una placa de microtubulación de 24 pocillos se añadió 1 mL de caldo de cultivo de *E. faecalis* junto con extracto etanólico de propóleo, extracto de acetato de etilo de propóleo o la formulación (F1) de nanopartículas de propóleo y quitosano (concentraciones de 100,200 y 300 µg/mL); a partir de allí se inocularon en agar tripticasa soya, diluciones en serie de bacterias planctónicas y biopelícula. Posteriormente, se evaluó el efecto antibacteriano al observar la disminución de la supervivencia bacteriana; las bacterias planctónicas y la biopelícula fueron más sensibles a la formulación de nanopartículas de propóleo y quitosano que a los extractos de propóleo, y su efecto fue más potente al aumentar la concentración (300 µg/mL). La biopelícula se visualizó con microscopio electrónico de escaneo y microscopio de fluorescencia, en ambas se observó la ruptura de la biopelícula por acción de las nanopartículas de quitosano/propóleo, los extractos de propóleo generaron ruptura parcial, demostrando la eficacia de las nanopartículas. En conclusión, los autores acuerdan que la nanoformulación de quitosano/propóleo tenía los parámetros fisicoquímicos para inhibir la formación bacteriana y alterar los genes responsables de la virulencia y formación de la biopelícula del *E. faecalis*; demostrando que tiene el potencial de ser desarrollado como terapéutico en la formación de la biopelícula bacteriana.

1.4.2 Actividad antimicrobiana del quitosano/propóleo sobre otras bacterias:

Franca et al.²⁵ en 2014 en la Universidad Federal de Minas Gerais - Brasil, estudiaron la actividad antimicrobiana de un barniz de propóleo a base de quitosano contra bacterias patógenas orales. Para tal fin, crearon un barniz de quitosano con tres diferentes concentraciones de propóleo, 15%, 10% y 5%, aplicados en incisivos bovinos. El estudio de la morfología de las películas formadas sobre las superficies dentales se evaluó a través de espectroscopia infrarroja. Las pruebas de susceptibilidad antimicrobiana se realizaron en cultivos de agar para las bacterias: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus salivarius*, *Lactobacillus casei*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* y *Fusobacterium nucleatum*, donde fueron aplicados discos de papel estériles que contenían los barnices en las 3 concentraciones. Luego de 48 h de incubación, midieron el diámetro de las zonas de inhibición para determinar el crecimiento bacteriano, obteniendo que todas las concentraciones de barniz de propóleo-quitosano inhibieron el crecimiento de todos los microorganismos probados. Sin embargo, no observaron diferencias significativas entre los barnices de 5%, 10% y 15%. Las zonas de inhibición fueron menores para los microorganismos anaerobios *P. gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans*, mientras que fueron mayores para *P. intermedia* y *F. nucleatum*. Las zonas de inhibición en microorganismos de biopelícula cariogénica (*S. mutans*, *S. sanguinis*, *S. salivarius* y *L. casei*) no arrojaron diferencias significativas entre ellas.

En el mismo año, De Luca et al.³¹ en la Universidad Federal de Minas Gerais - Brasil, estudiaron las propiedades antimicrobianas, citotoxicidad y liberación sostenida del extracto etanólico de propóleo verde brasilero en comparación con la clorhexidina. Prepararon 4 tipos de barnices (barniz de quitosano, barniz de extracto etanólico de propóleo, barnices de propóleo/quitosano al 5%, 10 % y 15 % y barniz de clorhexidina al 0,12%). La sensibilidad bacteriana fue detectada por el método de Kirby-Bauer, para ello se colocó papel de filtro estéril humedecido con 20 µL de cada

barniz sobre cepas de *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus salivarius* y *Lactobacillus casei*; luego se midió el halo inhibitorio formado a las 24 y 48 horas. Todos los barnices de propóleo arrojaron resultados de mayor inhibición bacteriana comparados con la clorhexidina. Los valores de concentración mínima inhibitoria y mínima bactericida del barniz de propóleo se determinaron en 0,6 – 1,2 mg/mL; el barniz que arrojó mejores resultados fue el de 15% de concentración de propóleo. Los autores concluyeron que estos barnices tienen actividad antimicrobiana contra las bacterias estudiadas, además de su baja toxicidad.

Ong et al.²⁶ en 2019 en Malasia, realizaron una investigación para determinar la actividad antimicrobiana y el sinergismo con otros antibióticos de las nanopartículas de quitosano/propóleo. Para determinar la actividad antimicrobiana utilizaron cepas de *Staphylococcus epidermidis*, a las cuales se les añadió varias concentraciones de etanol, extractos de acetato de etilo de propóleo y nanopartículas de quitosano/propóleo; posterior a su incubación y formación de la biopelícula, diluyeron en serie las bacterias planctónicas sobrenadantes y las bacterias de biopelículas. Las cuales colocaron en placas con agar tripticosa soya para determinar las unidades formadoras de colonias en cada una. Obteniendo como resultado que las nanopartículas de quitosano/propóleo en una concentración de 100 µg/mL demostraron ser más eficaces en la disminución de la supervivencia bacteriana tanto en biopelículas preformadas como en las bacterias planctónicas de *S. epidermidis* en comparación con los extractos de etanol y acetato de etilo de propóleo. Los autores concluyeron que los extractos etanólicos de propóleo y las nanopartículas de quitosano/propóleo tienen capacidad de inhibir la formación y eliminar la biopelícula establecida del *S. epidermidis*, sin embargo, tienen mejor eficacia las nanopartículas por sobre los extractos, adjudicado quizá por el menor tamaño de las partículas que pueden penetrar la biopelícula y eliminar la bacteria.

1.4.3 Actividad antimicrobiana del propóleo sobre *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*.

Akca et al.¹⁶ en 2015 en la Universidad de Turquía, realizaron un estudio para evaluar la eficacia del extracto etanólico de propóleo y la clorhexidina al 0,2% sobre células planctónicas de *Enterococcus faecalis* y *Staphylococcus aureus*. Se determinó la concentración mínima inhibitoria y bactericida del gluconato de clorhexidina (CHX) y el extracto etanólico de propóleo (EEP) en los medios de agar. Los resultados que consiguieron fue que el EEP inhibió el crecimiento de todas las especies como la CHX. Además, el análisis de las biopelículas de los microorganismos probados reveló que ambos agentes de prueba no fueron tan efectivos como lo fueron en las especies planctónicas. Sin embargo, mencionaron que la concentración de ambos agentes era suficiente para manifestar un efecto bactericida. El EEP obtuvo su mejor efecto bactericida para *E. faecalis*. Concluyeron que la administración de propóleos en concentraciones apropiadas podría ser efectiva sobre microorganismos bucales. Aunque CHX sigue siendo de los productos de enjuague bucal más comunes contra la amplia gama de microorganismos, el EEP puede servir como alternativa natural y enjuague bucal antimicrobiano confiable para evitar los efectos secundarios de CHX.

En el mismo año, Barragan³⁸ en la Universidad Central del Ecuador - Quito, realizó un estudio cuyo objetivo fue determinar la acción antibacteriana de la Procaína 2% más Cafeína 0.25% (impletol) y del extracto de propóleo (comercial) en 28 cepas de *Enterococcus faecalis* para utilizarlo como coadyuvante en la irrigación del tratamiento de conducto, comparando los resultados con el hipoclorito de sodio. Las cepas bacterianas se activaron e incubaron en anaerobiosis por 48 h, posteriormente se prepararon inóculos equivalentes al patrón 0.5 Mcfarland y se sembraron en agar sangre de cordero, luego se procedió a colocar discos de papel embebidos con las sustancias a estudiar para medir la presencia y diámetro de los halos inhibitorios tomando como criterio de sensibilidad un halo de 10 mm o más. Los resultados arrojaron que el hipoclorito de sodio tiene mayor actividad

antimicrobiana sobre *E. faecalis* en comparación con el extracto de propóleo; la cafeína no generó actividad antimicrobiana; concluyendo que el propóleo puede ser utilizado como coadyuvante a la irrigación con hipoclorito de sodio, pero su acción antimicrobiana es menor sobre *E. faecalis* y la solución de procaína 2% más cafeína 0.25% no tiene acción antimicrobiana.

Bucio et al.³⁹ en 2017 en la Universidad de La Salle Bajío, México. Realizaron una investigación con extracto etanólico de propóleo para evaluar su actividad antibacteriana sobre cepas de *Staphylococcus aureus* usando como medio el agar tripticasa soya, crearon cinco pozos de 6 mm de diámetro, en cada uno se colocó 40 µL de los extractos de propóleo o de los controles (etanol y agua). Las cajas de Petri fueron colocadas a 4 °C durante 12 horas para permitir la difusión del extracto en el medio de cultivo, y luego se incubaron a 37 °C por 24 horas, tomando al término de dicho tiempo el diámetro en centímetros del halo de inhibición. Se halló que los extractos de propóleo inhiben el crecimiento de *Staphylococcus aureus* con un halo de inhibición de 1,6 cm. Dicha actividad inhibitoria fue medida basándose en la presencia de una zona bien definida alrededor del pozo donde se colocó el propóleo.

Tapia⁴⁰, durante el año 2018 en la Universidad de Huánuco – Perú, realizó un estudio *in vitro* con el fin de determinar el efecto antibacteriano del extracto de propóleo frente al gluconato de clorhexidina al 0,12% como antiséptico bucal, sobre cepas de *Staphylococcus aureus*. Las bacterias fueron inoculadas en agar sangre, se adicionaron discos impregnados con extracto de propóleo al 30% y gluconato de clorhexidina al 0.12%, posteriormente fueron incubadas a 37 °C. A las 24 y 48 horas fueron medidos los halos de inhibición. Los hallazgos obtenidos fueron que el extracto de propóleo como antiséptico bucal *in vitro*, tuvo efecto antibacteriano de un 44% durante las 24 horas y de 56 % durante las 48 horas, mientras que el gluconato de clorhexidina al 0.12 %, obtuvo 50.5% de efecto para el tratamiento antibacteriano a las 24 horas de su aplicación y 49.5% a las 48 horas. Por lo que se concluyó que el

extracto de propóleo posee un mayor efecto antibacteriano que el gluconato de clorhexidina al 0.12% luego de 48 horas de su aplicación.

AL-Ani et al.⁴¹ en 2018 realizaron un estudio en la Universidad de Heidelberg, Alemania con el fin de investigar y comparar la composición química y actividad biológica de muestras de propóleo recolectadas en diferentes zonas geográficas (Alemania, Irlanda y República Checa). Las muestras de propóleo fueron molidas y mezcladas con etanol para obtener un extracto etanólico de propóleo y con agua para tener un extracto acuoso de propóleo. Dentro de las cepas evaluadas se encontraban *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa*, las cuales fueron cultivadas en agar Columbia suplementado con 5% de sangre de oveja y en caldo Müeller-Hinton, posteriormente determinaron la Concentración inhibitoria mínima (CIM) y la Concentración mínima bactericida (CMB). Los resultados obtenidos arrojaron que todos los extractos poseían actividad pero que el propóleo irlandés demostró mayor actividad bactericida frente a los microorganismos Gram positivos, seguidos del propóleo checo y alemán, donde para *Staphylococcus aureus* se encontró que en el extracto etanólico de propóleo alemán la CIM fue de 1,2 mg/mL y CMB de 2,5 mg/mL, el checo de CIM de 0,3 mg/mL y CMB 0,6 mg/mL, irlandés de CIM 0,08 mg/mL y CMB 0,1 mg/mL en el extracto acuoso del propóleo alemán la CIM 1,2 mg/mL y CMB 2,5 mg/mL. No obstante los extractos etanólicos presentaron una eficacia moderada frente a microorganismos Gram negativos, específicamente para *Pseudomonas aeruginosa* el extracto etanólico de propóleo alemán tuvo una CIM 2,5 mg/mL y CMB >5 mg/mL, el irlandés una CIM 0,6 mg/mL y CMB >5 mg/mL, el checo CIM 1,2 mg/mL y CMB >5 mg/mL, mientras que el extracto acuoso de propóleo alemán la CIM fue 2,5 mg/mL y CMB 5 mg/mL.

1.4.4 Actividad antimicrobiana del quitosano sobre *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*.

Jaiswal et al.²³ en el 2017 estudiaron nuevos irrigantes endodónticos con actividad antimicrobiana mayor o similar a los irrigantes convencionales (hipoclorito

de sodio). Crearon 9 grupos de soluciones para irrigar dentro de los cuales se encontraban: hipoclorito de sodio al 5%, clorhexidina 2%, ácido acético al 1%, propóleo, quitosano al 0,2%, quitosano al 0,2% + clorhexidina al 2%, quitosano al 1% + clorhexidina al 1%, quitosano al 2% + clorhexidina al 2% y solución salina (control negativo). 20 muestras de dientes premolares mandibulares previamente instrumentados fueron expuestos a formación de la biopelícula por *Enterococcus faecalis*, posteriormente irrigados con cada solución; luego de procesar las muestras, se inoculó la biopelícula bacteriana del canal radicular de las muestras en agar tripticosa soya para ser analizadas por unidades formadoras de colonias. Las soluciones de quitosano y clorhexidina demostraron un efecto antibacteriano mayor que el resto. Llegando a la conclusión de que la combinación de 1% de quitosano + 1% de clorhexidina y la solución de sólo clorhexidina tienen mejor eficacia antimicrobiana contra la biopelícula del *Enterococcus faecalis*; El hipoclorito de sodio tiene comportamiento antibacteriano similar a una solución de 2% de quitosano + 2% de clorhexidina y el propóleo demostró tener actividad antimicrobiana significativa, figurando éstos como posibles alternativas al hipoclorito de sodio en infecciones endodónticas, sin embargo, se ameritan estudios *in vivo* a largo plazo.

Pereira⁴² en 2018 realizó una investigación en la que buscó caracterizar, analizar y evaluar la influencia de la incorporación de bioactivos naturales con actividad antimicrobiana a membranas de quitosano para uso potencial como curativos en el tratamiento de lesiones cutáneas. Para ello, la autora creó membranas de quitosano solas y otras a las que adicionó bioactivos naturales (aceites de clavo y melaleuca, jugo y polvo de anacardo, pulpa y polvo de noni); éstas membranas se incorporaron en las placas de agar inoculadas con cepas de *Staphylococcus aureus* sembradas en medio de agar. Los resultados que obtuvo, mostraron que todas las formulaciones presentaron actividad antimicrobiana, sin embargo, las membranas de quitosano al 1%, quitosano al 1% con aceite de clavo al 3% y la de quitosano 1% con aceite de melaleuca al 1% demostraron ser más activas. Concluyendo que las membranas de quitosano con bioactivos naturales presentan actividad antimicrobiana con diferentes

espectros de acción y pueden ser utilizadas como curativos por sus propiedades y adherencia.

Imani Z. et al⁴³, en el 2018 en su estudio evaluaron comparativamente la eficacia de una nueva concentración de quitosano optimizada para el apósito de pulpectomías en comparación con formocresol y paramonoclorofenol alcanforado sobre cepas de *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*. El experimento *in vitro* utilizó 75 dientes caninos maxilares primarios a los que se desbridó y preparó biomecánicamente su canal radicular; se dividieron aleatoriamente 25 dientes para cada cepa bacteriana, luego se inocularon las cepas en los canales radiculares de cada grupo de dientes; de allí se obtuvo una suspensión bacteriana que se transfirió a un medio de agar de infusión cerebro corazón, exceptuando *Streptococcus mutans* que se cultivó en agar sangre, para tener un recuento base de colonias; posteriormente se adicionó 20 µL de cada agente antimicrobiano (Formocresol, paramonoclorofenol alcanforado y quitosano al 1.5%) dentro de los canales radiculares de los dientes hasta sellar los mismos para su incubación; finalmente, se repitió el procedimiento para el recuento de colonias y determinar el crecimiento bacteriano a las 24 h y a los 7 días del tratamiento. Los resultados demostraron que los tres antibacterianos son efectivos para reducir el crecimiento bacteriano, no hubo diferencia significativa en el efecto de las tres sustancias a corto plazo (24 h), el quitosano demostró un mejor efecto que el paramonoclorofenol alcanforado a los 7 días. Concluyeron así que deben realizarse estudios con diferentes concentraciones de quitosano para una óptima eficacia antibacteriana y estudios en animales y humanos, requeridos para confirmar los resultados obtenidos.

1.4.5 Actividad antimicrobiana del quitosano junto a otros componentes sobre las bacterias en estudio:

Martínez et al.⁴⁴ en el 2019 analizaron la actividad antibiopelícula y antimicrobiana de las nanopartículas lipofílicas de bismuto incluidas en membranas de quitosano, sin modificar las propiedades biológicas de las películas de quitosano.

Crearon membranas de quitosano-nanopartículas lipofílicas de bismuto (BisBAL NPs); la concentración mínima inhibitoria de las membranas se probó sobre cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina, *Enterococcus faecalis*. La concentración mínima inhibitoria de 100 μ M de BisBAL NPs logró inhibir el crecimiento de todos los microorganismos estudiados en 83% - 99%. Concluyendo que éstas membranas suplementadas son una alternativa innovadora para prevenir el riesgo de infección bacteriana local en regeneración tisular guiada.

1.5 Bases conceptuales

1.5.1 Microbiología de la cavidad bucal:

La cavidad bucal es un ambiente propicio para el desarrollo de microorganismos, ya que proporciona humedad, temperatura, pH y nutrientes adecuados para su crecimiento⁵. Las superficies bucales humanas son colonizadas por microorganismos horas luego del parto^{7,45}; por esto la microbiota de la cavidad bucal es considerada uno de los ecosistemas más antiguos y diversos³, donde se hallan más de 700 especies bacterianas⁴⁵.

La variedad de hábitats en la mucosa bucal hace que el microbioma bucal sea una tarea compleja de entender; dicha diversidad de microorganismos depende de las concentraciones de oxígeno, la disponibilidad de nutrientes, la temperatura, la exposición a factores inmunológicos y las características anatómicas³.

La evolución de técnicas como la metagenómica ha permitido identificar de forma más precisa la composición y funciones de estas comunidades microbianas; determinando diversos géneros³ encontrados en diferentes hábitats de la cavidad bucal como lengua, tejidos blandos y saliva⁷; donde se hallan principalmente *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Veillonella*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Treponema*, *Neisseria*, *Haemophilus*, *Eubacterias*, *Lactobacterium*, *Capnocytophaga*, *Eikenella*, *Leptotrichia*, *Peptostreptococcus*, *Staphylococcus* y *Propionibacterium*³

La mayoría de estos microorganismos exhiben en la cavidad bucal una capacidad simbiótica³, son denominados comensales en equilibrio con el hospedero¹

colaborando con los mecanismos de defensa del mismo para controlar el crecimiento y reproducción del micro-ecosistema que habita en la cavidad bucal; pero al mismo tiempo estos microorganismos se hallan implicados en la generación de enfermedades infecciosas como la gingivitis, periodontitis y caries¹, cuando se produce disbiosis, es decir, un cambio en la variedad o en la proporción poblacional de estas especies^{1,46}.

La microbiota bucal tiene un papel importante en el estado de salud de la cavidad bucal, cumpliendo la función de impedir la implantación de patógenos oportunistas¹, éstos últimos son microorganismos exógenos, que no producen afección típica bucal, sin embargo, pueden causar sobreinfecciones, siendo algunos de ellos *Staphylococcus aureus*⁴⁷, *Pseudomonas aeruginosa*, Enterobacterias como *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoneae*, entre otras; cuya importancia radica en la gran cantidad de factores de virulencia⁸, que los hace reconocer como patógenos en otros sitios orgánicos, pudiendo dificultar el tratamiento de distintas afecciones⁸.

Estudios plantean que la prevalencia del desarrollo de enfermedades crónicas bucales se relaciona con las biopelículas⁴⁸, descritas como comunidades ecológicas, que tienen capacidad cooperativa, resisten las defensas naturales del hospedador así también pudiendo resistir los antibióticos y agentes antimicrobianos⁴⁹. Esto es de interés pues bacterias exógenas bucales como *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* son patógenos con la capacidad de formar biopelículas⁴⁸.

Staphylococcus aureus es un coco Gram positivo que se agrupa en forma de racimo de uva^{6,49,50}, aerobio inmóvil y no esporulado, considerado el no esporulado más resistente⁴⁹, también es catalasa y coagulasa positivo, capaz de resistir medios con altos porcentajes de salinidad, el calor, la desecación⁵⁰, algunos antisépticos⁴⁹ y posee el poder de producir Penicilinasas o β -Lactamasas, enzimas que destruyen la penicilina⁴⁹. Es considerado un oportunista transitorio en la microbiota bucal pues se halla comúnmente en nariz y piel; sin embargo, se le relaciona con el desarrollo de infecciones de cabeza y cuello, como abscesos e infecciones piógenas, endocarditis⁴⁷, infecciones endodónticas, osteomielitis de los maxilares, periodontitis, estomatitis⁴⁹ y otras patologías como parotiditis y mucositis oral⁶.

Por otro lado, *Pseudomonas aeruginosa* es un bacilo gramnegativo^{50,51}, aerobio, poco exigente para su crecimiento^{50,52}. Hallado comúnmente en el medio ambiente y el agua⁵⁰, su capacidad de formar biopelículas⁴⁸ le permite proliferar en medios acuáticos⁵⁰ como las líneas de agua y ductos de salida de unidades odontológicas⁵¹. Microbiológicamente esta bacteria es de rápido crecimiento, forma colonias planas, es β -Hemolítica y en placa se observa de un color verde característico de los pigmentos que produce, específicamente la pioverdina.⁵³

P. aeruginosa es un patógeno resistente a ciertos antimicrobianos^{52,53}, a pesar de ser un microorganismo exógeno de cavidad bucal desempeña un papel importante en infecciones periimplantares⁴⁹ y en la enfermedad periodontal. Al ocurrir un desequilibrio enzimático en cavidad bucal, es capaz de unirse a los tejidos, dicho proceso es relevante ya que la elevación de enzimas (proteasa) se genera en pacientes con enfermedad periodontal o mala higiene bucal⁴⁹. Lo que explica el hecho de que esta bacteria sea considerada un factor agravante de la enfermedad periodontal, que sirva de reservorio para que se genere dicha enfermedad y/o que dificulte el uso de tratamientos convencionales, poniendo en riesgo la vida de los pacientes específicamente inmunocomprometidos⁵⁴.

Enterococcus faecalis es un coco Gram positivo^{23,37,55} que generalmente se dispone en pareja y cadenas cortas, puede crecer en forma aerobia y anaerobia^{37,53,55}, además de ser un potencial patógeno debido a su capacidad de adherirse a la dentina⁵⁶. Éste microorganismo ha sido aislado en cavidad bucal^{37,49} específicamente en conductos radiculares²³, considerado un patógeno oportunista con capacidad de subsistir junto a la microbiota habitual de conductos radiculares dentarios³⁷ y formar biopelículas, lo que explica su relación con las infecciones intraradiculares persistentes^{37,49,55}. Estudios revelan su presencia en los conductos radiculares sellados de dientes con periodontitis apical crónica²³, además se asocia a patologías como infecciones pulpares, periapicales y a la mayoría de los fracasos de tratamientos endodónticos²³

1.5.2 Antimicrobianos

Un antimicrobiano es definido como toda sustancia de origen natural, sintética o semisintética, que actúa inhibiendo los microorganismos y ejerce su acción a nivel molecular en un proceso metabólico o en una estructura concreta de un microorganismo⁵⁷. Son también medicamentos que eliminan microorganismos, impiden su multiplicación y/o desarrollo. Estos se dividen en antibacterianos, antivirales, antimicóticos, antimicobacterianos, antiparasitarios y antirretrovirales⁵⁸. Desafortunadamente, con la producción de antimicrobianos ha venido un gran incremento de resistencia por parte de bacterias, hongos, parásitos y virus⁵².

1.5.2.1 Resistencia antimicrobiana

La resistencia a los antibióticos es la capacidad de un microorganismo de resistir los efectos de un antimicrobiano, puede ser producida por selección natural, como producto de mutaciones ocurridas al azar o puede inducirse mediante la aplicación de presión selectiva a una población⁵⁹. Como cualquier especie viviente, las bacterias poseen la capacidad de desarrollar diversos mecanismos de defensa ante cualquier tipo de amenaza que atente contra su vida, sobrevivencia y reproducción⁵⁹, como cambios y adaptaciones, tanto genéticas como en su estructura, que los han convertido en resistentes a los mismos⁵⁹. Por tal razón, la OMS ha designado la Resistencia Antimicrobiana (RAM) como uno de los tres problemas más importantes que enfrenta la salud humana en este siglo al constituir una de las mayores amenazas para la salud mundial⁵².

1.5.2.2 Método de prueba de susceptibilidad antimicrobiana.

Existe una variedad de métodos de laboratorio para evaluar o analizar la actividad antimicrobiana *in vitro* de un extracto o un compuesto puro⁶⁰ y así crear oportunidades para la fabricación de nuevos medicamentos para el control microbiano⁶¹; donde se pueden encontrar, pruebas estandarizadas *in vitro*⁶¹ conocidas como bioensayos⁶⁰ de susceptibilidad antimicrobiana⁶¹, siendo la difusión en disco, la

difusión de pozos y la dilución en caldo o en agar las más comunes comunes⁶⁰. Dichos métodos pueden clasificarse en métodos cuantitativos y cualitativos^{61,62}.

Los métodos cualitativos, posibilitan el determinar si un microorganismo patógeno presenta resistencia a diversos antimicrobianos⁶², sin buscar la concentración mínima inhibitoria⁶². Existen diversos métodos para la evaluación preliminar de la actividad antimicrobiana, donde los más utilizados son: el método de Kirby-Bauer también conocido como antibiograma⁶² o de difusión en disco⁶¹ y el método de difusión de pozo en agar⁶¹. Que consisten en la difusión en placa de una cepa⁶² de manera homogénea⁶¹; sobre ella se aplican discos^{61,62} de papel filtro⁶² o se deposita en un pozo en el agar de la placa, una cantidad determinada de la sustancia a probar⁶¹. Los resultados obtenidos se expresan con la medición del diámetro de los halos de inhibición producido por los extractos⁶¹.

Los métodos cuantitativos son procedimientos que permiten determinar la (CIM)^{61,62}, la cual se entiende como la concentración más baja de la sustancia capaz de inhibir el crecimiento visible del microorganismos⁶¹ posterior a su incubación⁶³. Los métodos de dilución son los más apropiados⁶¹ y se dividen en dilución en agar⁶¹ y dilución en caldo⁶¹.

En la dilución en agar, se mezcla una concentración determinada de la sustancia en estudio⁶³, luego se procede a inocular^{61,63} por extensión en la superficie del agar 1 mL del cultivo microbiano a estudiar, incubándose por el tiempo determinado para cada microorganismo⁶¹. La concentración que se determina como CIM es aquella donde la placa con la concentración más baja es capaz de inhibir al microorganismo, por lo cual no se observa crecimiento visible del mismo⁶¹.

En la dilución en medio de cultivo líquido o dilución en caldo⁶¹, se obtendrá una concentración final de la sustancia en estudio en el medio, de la misma manera que en la dilución en agar⁶¹. No obstante, los resultados se interpretan de manera diferente, ya sea por turbidimetría o indicadores REDOX⁶¹. Se considera como CIM aquella concentración en la que no haya cambio de color o turbidez⁶¹

1.5.3 Gluconato de Clorhexidina

1.5.3.1 Historia de la Clorhexidina

La clorhexidina es un antiséptico que se descubrió a finales de 1.940, cuando se desarrollaron agentes denominados polibisguanidas que tenían amplio espectro antimicrobiano^{11,14,15} de uso muy extendido en odontología¹¹. Se introdujo al comercio en 1.950 como un antiséptico general y luego fue ampliamente utilizada en medicina y cirugía. Las propiedades antibiopelícula se estudiaron en 1.969 por Schroede y sus efectos anticaries por inhibición de la biopelícula dental fueron estudiadas en 1.972 por Loe y Schiott¹⁴.

1.5.3.2 Mecanismo de acción

La clorhexidina tiene la capacidad de ser absorbida en la hidroxiapatita del esmalte dental, las proteínas salivares, la biopelícula y las moléculas ácidas debido a su carga positiva; esta cualidad le permite su posterior liberación, teniendo un efecto residual¹³.

En un estudio se demostró que la molécula catiónica de la clorhexidina interactúa con las bacterias por la pared celular aniónica de la misma, alterando las estructuras superficiales y aumentando la permeabilidad de la membrana bacteriana, facilitando así la entrada de la clorhexidina en el citoplasma bacteriano¹³; debido al desequilibrio osmótico y a la precipitación de los componentes citoplasmáticos se impide la reparación de la membrana bacteriana y por consiguiente se da la muerte celular¹³.

1.5.3.3 Usos clínicos

Es el agente antimicrobiano de primera elección considerado como *gold standard*, con quien se realizan comparaciones y se evalúa la eficacia de otros agentes antimicrobianos¹⁵. La clorhexidina tiene un amplio espectro de actividad que abarca bacterias Gram positivas, Gram negativas, virus (incluidos el VIH y el HBV), hongos de levadura y dermatofitos¹⁵. En la clínica de odontológica es utilizada para limpiar los campos operatorios y desinfectar canales radiculares¹³.

1.5.3.4 Efectos adversos

A pesar de los beneficios de la clorhexidina, autores han reportado que el uso prolongado de este antimicrobiano trae consigo efectos adversos¹⁵, que incluyen coloraciones parduzcas en dientes, restauraciones presentes en boca y en el dorso de la lengua^{11,14}, además de presentarse en algunas ocasiones alteración transitoria de la sensación del gusto y sensación de urente en la mucosa bucal¹¹.

1.5.4 Productos naturales de uso odontológico con capacidad antimicrobiana

Hoy en día existe variedad de productos naturales que se muestran como alternativas contra las enfermedades, donde se pueden hallar extractos naturales como por ejemplo el té verde, aloe vera, propóleo, manzanilla, diente de león, entre otros⁶⁴.

Los productos naturales son importantes para la investigación farmacológica y el desarrollo de medicamentos². En odontología, la fitoterapia ha sido utilizada ampliamente como analgésico, antiinflamatorio, antibiótico y para uso sedativo⁶⁵, es conocido que existen biomateriales como el quitosano con un rango de propiedades biológicas, así como biocompatibilidad y biodegradación, requeridas para las aplicaciones biomédicas²⁹. Como ya se mencionó el propóleo es un producto de origen natural de gran interés, conocido por sus propiedades biológicas, incluyendo propiedades antibacterianas, antisépticas, antiinflamatorias y antimicrobianas².

1.5.5 Propóleo

1.5.5.1 Historia

Esta sustancia elaborada por las abejas es conocida por el hombre desde tiempos remotos⁶⁶, siendo usada como medicina tradicional tanto por las antiguas civilizaciones como por las nuevas⁶⁷ desde el año 300 a.C⁶⁸. Sus actividades curativas fueron empleadas en la antigua Grecia⁶⁶⁻⁶⁸ y Roma⁶⁶⁻⁶⁸. Debido a sus propiedades antisépticas y cicatrizantes fue utilizada por reconocidos filósofos y médicos como, Aristóteles⁶⁶⁻⁶⁸, Dioscorides^{67,68}, Galeno^{66,68} y Plinio^{67,68}.

En el antiguo Egipto los propóleos fueron utilizados⁶⁶⁻⁶⁸ para preservar los cuerpos de su descomposición^{67,68} y tratar heridas⁶⁸, por otro lado los Incas hacían uso del mismo como antipirético^{66,67}. Fue reconocido como agente bacteriano durante los siglos XVII y XX en Europa⁶⁸. Su máximo empleo se dio durante la guerra de los Boers, en África del Sur, alrededor de 1900, al igual que en la segunda guerra mundial en el tratamiento de heridas infectadas y como sustancia cicatrizante^{66,68}

Su utilización se ha mantenido durante siglos, hasta llegar a nuestros días⁶⁶, donde las preparaciones a base de propóleo han incrementado su popularidad, siendo usadas en suplementos dietéticos y aplicaciones cosméticas⁶⁷, en forma de cápsulas, lociones, ungüentos, y aerosoles⁶⁷. Sus propiedades antimicrobianas han sido estudiadas y documentadas⁶⁷, en la actualidad se está estudiando las preparaciones a base de propóleo en los campos de la biología, medicina humana y veterinaria⁶⁶.

1.5.5.2 Composición química

Su composición general es a base de resinas, además de cera^{22,26,27} aceites aromáticos²² a partir de las plantas^{16,21-23} y exudados de las cortezas de los árboles^{21,24-26}, polen u otras sustancias. No obstante su composición química varía entre sí^{16,18,22,26,27}, debido al origen de diferentes plantas^{18,69}, su fuente de procedencia^{2,16,22,26,27}, paradero climático^{18,24,66,69}, geográfico^{18,24,69}, método de extracción^{16,22,24}, tipo de abejas^{22,18} y flora^{1,18,22,66}.

Se han identificado más de 180 compuestos como componentes del propóleo⁶⁶⁻⁶⁸, entre los cuales se han identificado como biológicamente activos⁶⁷, los flavonoides^{18,22,24,26,27,50,66,67,69-71} y los fenólicos^{1,2,18,22,24,26,27,67,69}. Dentro de estos componentes químicos previamente identificados encontramos: alcohol cinnámico⁶⁷, ácido cinámico⁶⁷, vainillina⁶⁷, alcohol bencílico⁶⁷, ácido benzoico^{1,67}, ácidos cafeicos^{1,18,67}, ácidos ferúlicos^{1,67} triglicéridos fenólicos⁶⁷, pterostilbeno⁶⁷, eugenol⁶⁷ y ésteres de pentenilo del ácido cafeico⁶⁷. Todos estos compuestos forman parte de la fracción resinosa del propóleo⁶⁹, estos presentan un efecto sinérgico entre

ellos⁶⁹, lo cual brinda gran parte de sus propiedades terapéuticas^{68,69} en humanos y animales⁶⁹.

1.5.5.3 Propiedades biológicas

El propóleo es conocido por sus diversas propiedades terapéuticas en donde se destacan: antibacteriana^{24,50,68,69}, antiinflamatoria^{24,50}, antifúngica^{24,68,69,72}, antiviral^{24,50,68,69,72}, antioxidante^{68,69}, inmunomoduladora⁶⁹, anticancerígeno^{2,18,21,22,24,26}, cicatrizante⁵⁰, antiparasitaria⁷², entre otras^{24,50,68,69}, las cuales son adjudicadas a los flavonoides^{50,66,69}.

1.5.5.4 Acción antimicrobiana

A pesar de sus modificaciones en las estructuras químicas debido a su origen según su ubicación geográfica⁶⁸, la actividad antimicrobiana sigue siendo una de las propiedades más conocidas del propóleo⁶⁹, gracias a su acción bacteriostática y bactericida⁶⁹, la cual se basa en la inhibición de ácidos nucleicos⁶⁹ y degradación de la membrana citoplasmática⁶⁹.

Se les atribuye mayor eficacia frente a microorganismos Gram positivos^{50,68,73} como *Streptococcus sanguinis*¹⁹, *Staphylococcus aureus*^{18,22,24,50,71}, *Streptococcus beta hemolitico*⁵⁰, *Mycobacterium tuberculosis*²⁴, *Bacillus larvae*²⁴ (*Paenibacillus larvae*), *Bacillus subtilis*²⁴, *S. mutans*^{18,19,22-24,71} y *Enterococcus spp*⁷¹, no obstante, numerosos microorganismos Gram negativos^{50,73} también presentan sensibilidad, hallando bacterias como *Escherichia coli*^{18,24,71}, *Salmonella*²⁴, *Shigella*²⁴, *Dichelobacter nodosus*²⁴, *Klebsiella pneumoniae*²⁴, *Porphyromonas gingivalis*^{18,22}, *Prevotella nigrescens*²² y *Prevotella intermedia*^{18,22}, donde algunos de ellos presentan resistencia a los antibióticos²⁴

1.5.5.5 Reacciones adversas

Las reacciones adversas de los propóleos son muy escasas. En una serie de casos realizada en el año 2004 por Fernández et.al⁷⁴ nombran que pueden existir

manifestaciones al contacto directo con los propóleos tales como hipersensibilidad de tipo dermatitis y reacciones alérgicas⁷⁴. Casos presentes en apicultores⁷⁴

1.5.5.6 Usos en Odontología

El propóleo debido a la gran cantidad de propiedades ya mencionadas, se ha llevado paulatinamente a la práctica de la salud bucodental, para así beneficiarse de las mismas⁷¹. Siendo usado en el tratamiento de la caries dental^{19,71}, aftas en boca⁷¹, herpes⁷¹ y amigdalitis⁷¹.

Se ha estudiado y utilizado en las diversas especialidades de la Odontología⁷¹, tales como periodoncia, como coadyuvante en el tratamiento de las enfermedades periodontales^{19,75}, endodoncia como medicación intraconducto^{76,77}, ortodoncia en adición a los agentes cementantes comúnmente usados mejorando su función y durabilidad⁷⁸, prostodoncia en el tratamiento de *C. albicans* en pacientes portadores de prótesis⁷⁹, operatoria dental como desensibilizante en la hipersensibilidad dentinaria⁸⁰, cirugía como agente antibiótico posquirúrgico⁸¹ y como coadyuvante en la cicatrización posquirúrgica⁸².

1.5.6 Quitosano

1.5.6.1 Historia

El quitosano es un biopolímero que es obtenido de la quitina⁸³, fue estudiada y observada por primera vez en hongos⁸³ por el profesor francés Henri Braconnot en el año 1811⁸³⁻⁸⁵, mientras que el quitosano data del año 1859^{83,84} con el trabajo de Rouget^{83,84}, quien trató la quitina con un fuerte alcalino, lo que produjo una nueva sustancia que a diferencia de la quitina, podía disolverse en soluciones acuosas ácidas⁸³, otorgándole el nombre de “quitina modifié” o quitina modificada⁸³.

En 1894, Hoppe-Seyler trató las conchas de cangrejos, escorpiones y arañas^{83,84} con hidróxido de potasio a 180 °C donde halló un “nuevo” producto⁸³, al cual le otorgó el nombre de quitosano^{83,84}. Este producto era un derivado de quitina soluble en ácido, parcialmente desacetilado⁸³.

A mediados de 1930⁸³, la estructura de la quitina y el quitosano se caracterizó utilizando datos de difracción de rayos X y posteriormente mediante análisis enzimático y espectroscopia infrarroja⁸³. En la misma década, las primeras películas y fibras de quitosano fueron patentadas^{83,84} y en el año 1936⁸³, tuvo su primer uso en la industria de fabricación de papel^{83,84}, textil⁸⁴, fotografía⁸⁴ y como adhesivos⁸⁴

De 1950 a 1970, la quitina y el quitosano entraron en un período de duda, aunque también se había avanzado mucho en su aislamiento^{83,84}, producción y fundamentos⁸³, no fue hasta la década entre 1970 a 1980⁸⁴, que la quitina y el quitosano entraron en el período en el que alcanzaron la madurez⁸⁴. En la actualidad, existen más de 2000 aplicaciones de quitina, quitosano y sus numerosos derivados⁸⁴. Estos biopolímeros continúan ofreciendo nuevos horizontes científicos e industriales con una amplia gama de posibles modificaciones y formas⁸⁴.

1.5.6.2 Composición química

El quitosano se obtiene mediante la desacetilación termoalcalina parcial o total de la quitina, donde sale el grupo acetilo permaneciendo los grupos amino en la misma posición⁸⁶. Químicamente el quitosano posee carbono (44,1%), hidrógeno (6,84%) y nitrógeno (7,97%), con un peso molecular medio de $5,3 \times 10^5$ Daltons⁸⁷ y está compuesto de β - (1,4)-2-amino-2-deoxiD-glucopiranosas^{33,86} (unidades desacetiladas) con pequeños residuos o no de N-acetil-D-glucosamina (unidades acetiladas)³³. Estos pequeños residuos permiten determinar la pureza del quitosano puesto que esta depende del grado de desacetilación³³ alcanzado en la quitina³³.

1.5.6.3 Propiedades biológicas

Los biomateriales derivados del quitosano han recibido considerable atención debido a sus características excepcionales, tales como: biocompatibilidad^{23,28,30-32,34,87,88}, biodegradabilidad^{23,28,30,31,87-89}, ser bioabsorbible⁸⁷, funcional⁸⁷, renovable⁸⁷, no tóxico^{23,30,32,34,87}, capacidad de esterilizarse por cualquier método⁸⁸, además de contar con propiedades antimicrobianas⁸⁷⁻⁸⁹, antifúngicas⁸⁸, mucoadhesivas⁸⁸,

hemostáticas^{21,30,88}, analgésicas^{30,88}, antivirales¹³, antigénico⁹⁰, cicatrizantes¹³, antitumorales¹³ y con capacidad de formar membranas⁹⁰

Como ya se mencionó, la biodegradabilidad y actividad antimicrobiana hacen a este material ideal para la elaboración de películas utilizadas en la industria alimenticia y biomédica⁸⁹

1.5.6.4 Acción antimicrobiana

Una de las propiedades más prometedoras es la actividad antimicrobiana, la cual se basa fundamentalmente en la atracción electrostática del quitosano con diversos componentes de la pared y membrana celular de bacterias que tienen componentes con carga negativa⁹¹.

El quitosano ha demostrado ser eficaz contra patógenos bucales como *Streptococcus mutans*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y *Porphyromonas gingivalis*, los cuales son precursores en la formación y crecimiento de la biopelícula⁹¹. Además de presentar efectos inhibitorios contra *P. aeruginosa* y *P. mirabilis*, *Enterococcus* spp, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium*, *Shigella dysenteriae*, *Klebsiella pneumoniae* y *Vibrio cholerae*⁹¹

1.5.6.5 Reacciones adversas

Gavhane et al. 2013 reportaron que el quitosano no posee ninguna contraindicación, sin embargo, destacó algunas limitaciones como la alergia, la cual se refleja en flatulencias y constipación. Por otra parte, refieren que las personas con síndrome de mala absorción intestinal no deben usar quitosano, también informaron que genera efectos adversos sobre el crecimiento de niños y sobre el resultado del embarazo⁹²

1.5.6.6 Usos en Odontología.

Como se ha venido mencionando el quitosano posee múltiples propiedades, donde su alta bioactividad es una de las más resaltantes, la cual hace crecer el interés por este material y así desarrollar nuevos biomateriales a partir de él⁹³.

Los agentes antibacterianos en el área odontológica pueden llegar a ser un desafío, ya que la concentración de dicho agente debe ser adecuada para inhibir o reducir la formación de biopelículas, sin excederse al nivel de citotoxicidad, donde el efecto no debe estar limitado en el tiempo y las propiedades mecánicas, químicas y estéticas del material no decaigan. El quitosano, como biopolímero proporciona todas las propiedades anteriores, pudiéndose transformar en diversas formas (soluciones, películas y compuestos)⁹³

En Odontología se ha usado y estudiado en diversas áreas. En cirugía ha sido usado en la curación de tejidos⁹³, regeneración ósea^{93,94} y hemostasia postexodoncias⁹³, en operatoria dental como recubrimiento pulpar⁹⁴, en endodoncia como irrigante de los conductos radiculares⁹⁴, en periodoncia ha sido usado para tratar la enfermedad periodontal en forma de gel y disminuir la profundidad de los sacos periodontales y en odontología preventiva ha sido estudiado como enjuague bucal y pasta dental arrojando disminución considerable en el acumulo de biopelícula y recuento bacteriano⁹⁴

1.5.7 Membranas de quitosano.

En la actualidad, se ha hecho uso de gran cantidad de tipos de materiales como membranas, micro y nanopartículas, considerados andamios en el área biomédica⁹⁰, donde las membranas basadas en polisacáridos de origen natural son las más utilizadas⁹⁵, en las que se hallan las de quitosano, siendo estas biodegradables^{90,95,96}, además de que el quitosano existe en gran abundancia en la naturaleza⁹⁵, permitiendo así costos relativamente bajos en la producción de las mismas⁹⁵; sin embargo, el quitosano posee una peculiar particularidad de poder liberar compuestos bioactivos⁹⁰. Debido a estas y sus demás propiedades, el quitosano fue aprobado para su uso como

biomaterial por la Administración de Drogas y Alimentos (FDA, por sus siglas en inglés)⁹⁰.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

1.6 Alcance y diseño de investigación

El alcance de esta investigación es explicativo⁹⁷ ya que su desarrollo permitió determinar la existencia o no de actividad antimicrobiana de las membranas de quitosano/propóleo sobre las cepas bacterianas en estudio.

Por otro lado el diseño es de tipo experimental⁹⁷, en un contexto de laboratorio⁹⁷, ya que se realizaron pruebas *in vitro*, donde se estableció el posible efecto antimicrobiano de las membranas de propóleo/quitosano sobre las cepas bacterianas; asimismo, es considerado como experimento puro debido a que para lograr una validez interna, se crearon grupos por triplicado de cada bacteria a estudiar con las membranas de quitosano/propóleo, más otro grupo de comparación con el antimicrobiano bucal considerado como el tratamiento de elección y así evaluar la efectividad antimicrobiana de las membranas.

1.7 Población y muestra

1.7.1 Muestra Biológica.

La muestra estuvo conformada por 3 cepas bacterianas: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, pertenecientes al cepario de la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Odontología de la Universidad de Los Andes.

1.8 Sistemas de variables

El siguiente sistema de variables está dividido en 3 fases, en concordancia con el apartado de procedimiento y el plan de análisis de resultados.

1.8.1 Fase I.

Variables independientes:

- Tintura de propóleo.
- Gel de quitosano.

Variable dependiente:

Diámetro de los halos inhibitorios medidos en milímetros en cada placa de Petri inoculada con las cepas bacterianas.

Indicador: Escala de Duraffourd.

Sub Indicadores: Inhibición nula (-) = inferior a 8mm.

Sensibilidad límite sensible (+) = entre 8 y 14mm.

Medio muy sensible (++) = 14 a 20mm.

Sumamente sensible (+++) = diámetro superior a 20mm.

En esta fase tenemos una variable ordinal.

1.8.2 Fase II.

Variable independiente:

- Tintura de propóleo.

Variable dependiente:

Presencia o ausencia de turbidez.

Esta fase cuenta presenta una variable cualitativa nominal dicotómica.

1.8.3 Fase III.

Variable independiente:

- Membrana de Quitosano/Propóleo

Variable Dependiente:

Diámetro del halo inhibitorio medido en milímetros en cada cepa bacteriana.

Indicador: Escala de Duraffourd.

Sub Indicadores: Inhibición nula (-) = inferior a 8mm.

Sensibilidad límite sensible (+) = entre 8 y 14mm.

Medio muy sensible (++) = 14 a 20mm.

Sumamente sensible (+++) = diámetro superior a 20mm.

En esta última fase contamos con una variable ordinal.

1.9 Técnicas e instrumentos de recolección de datos

Se utilizó como técnica de recolección de datos la observación directa⁹⁷ para determinar la presencia o ausencia de crecimiento bacteriano, junto a la existencia o no de halos inhibitorios en las cepas bacterianas, y la observación técnicamente asistida⁹⁷ para medir el diámetro de los halos inhibitorios en las cepas bacterianas utilizando un instrumento de medición (vernier).

El instrumento que permitió recolectar los datos microbiológicos e información relevante, es una ficha de registro (Apéndice A), realizada por los investigadores y sometida a evaluación por tres expertos en el área. Dicho instrumento cuenta con tres ítems o secciones; en los cuales se registró la información correspondiente a:

1. Medida de los halos inhibitorios en la pruebas de susceptibilidad microbiana ante los productos naturales por separado.
2. Concentración mínima inhibitoria de la tintura de propóleo que fue determinada.
3. Medida de los halos inhibitorios en la pruebas de susceptibilidad microbiana ante la membrana de quitosano/propóleo.

Es importante acotar que en los tres *ítems* se registraron los datos correspondientes a los grupos controles positivos y negativos de cada experimento.

1.9.1 Validación del instrumento

Como se menciona en el apartado anterior, el instrumento de recolección de datos fue sometido a evaluación y validación por parte de 3 expertos en el área de estudio, para evitar comprometer los resultados y la credibilidad de las conclusiones de la investigación.

1.10 Procedimientos, materiales e instrumentos.

1.10.1 Materiales:

Tabla 1 Materiales para proceso experimental

Agar Hinton. ACUMEDIA LAB.	Müeller- Tintura de propóleo comercial (Extracto etanólico de propóleo al 45%).	Pipetas automáticas LABMATE 10-100µL: FINNPIPETTE DIGITAL 200-1000µL	Lámparas de luz UV.
Agar soya. HiMedia®	Tripticasa Quitosano en polvo Quitosan®, GUINAMA.	Puntas estériles para pipetas automáticas	Esterilizador de vapor de agua (autoclave). ALL AMERICAN 25X
Caldo Nutriente HiMedia®	Asa de Kolle	Alcohol Isopropílico 70%	Alcohol Etilico 100%
Gluconato de cloherxidina 0,12%. Peridont®	de Microondas SHARP	Microscopio NIKON ECLIPSE E100	Incubadora MEMMERT 12880.
Ácido acético.	Papel de filtro	Tubos de ensayos	Estufa de calor seco.
Agua destilada.	Pinzas	Mecheros.	Hisopos.
Tijeras	Placas de Petri.	Vernier.	

1.10.2 Procedimientos.

Para una mejor comprensión de los procedimientos experimentales realizados se dividió esta sección en tres fases.

Fase I:

Obtención de los agentes antimicrobianos a estudiar.

La Tintura de Propóleo (TP) utilizada se adquirió en la Tienda Apícola ubicada en la calle 21 entre Avenidas 7 y 8. Sector El Espejo de la ciudad de Mérida -

Venezuela. De acuerdo a las especificaciones del fabricante se trata de una tintura de propóleo elaborada al 45% p/v de propóleo.

Por su parte el quitosano en su presentación de gel se obtuvo del Centro de Investigaciones Odontológicas de la Facultad de Odontología de la Universidad de Los Andes (ULA)⁹⁸. El cual consiste en una solución ácida de quitosano obtenida a partir de la mezcla de 5 gr de quitosano Quitosan®, GUINAMA certificado para uso médico, con una dilución de 2 mL de ácido acético al 99 % en agua destilada para luego pasarlo a una plancha de calentamiento con agitador, dejando en agitación constante por 12 horas, obteniendo un gel de quitosano ácido al 5%. El volumen total de la solución de quitosano fue doblemente filtrada para eliminar las impurezas y microorganismos que pudieran contaminar la solución.

En la imagen 1, se aprecian las sustancias empleadas para la prueba de susceptibilidad antimicrobiana, de derecha a izquierda se encuentran respectivamente Gel de quitosano (GQ), Gluconato de clorhexidina al 0,12% (CHX), TP y etanol.



Imagen 1 Sustancias para prueba de susceptibilidad antimicrobiana.

Preparación de los inóculos bacterianos.

Se realizó la reactivación de los monitores biológicos, inoculando 20 μ L de la cepa en tubos de agar fundido tripticasa soya (HiMedia), el medio se vertió en una placa de Petri para su solidificación, posteriormente se incubaron a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$ por 24 horas las tres placas pertenecientes a cada cepa.

De las placas de agar con las cepas reactivadas (imagen 2) se tomaron inóculos con el asa de Kolle para realizar diluciones en tubos de 5 mL de solución fisiológica salina estéril (imagen 3) hasta lograr la turbidez 0.5 de la escala McFarland como se puede observar en la imagen 4. Repitiendo este procedimiento para cada cepa por separado.

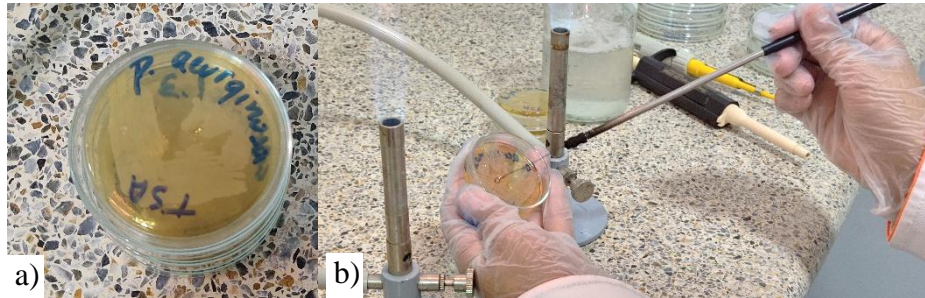


Imagen 2 a) Placa de Petri con cepa de *Pseudomonas aeruginosa* reactivada. b) Recolección del inóculo de las cepas reactivadas.



Imagen 3 Suspensión del inóculo en tubo con solución salina estéril para lograr la turbidez según escala 0.5 McFarland.

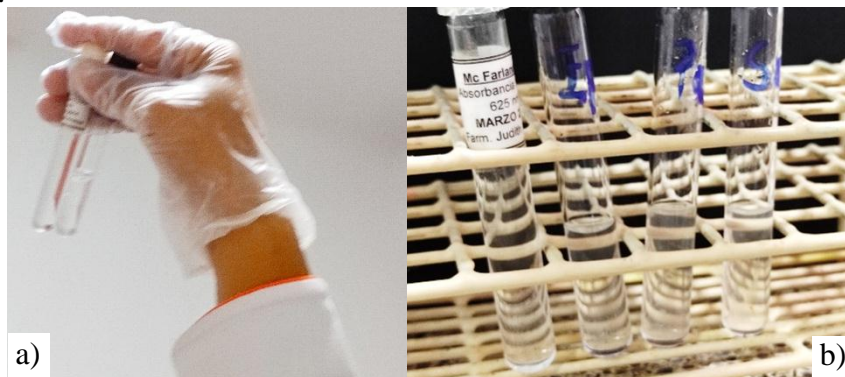


Imagen 4 a) Comparación visual del inóculo con el estándar 0.5 McFarland. b) Se observan de izquierda a derecha tubos de ensayo correspondientes al estándar 0.5 McFarland, suspensión bacteriana de *E. faecalis*, *P. aeruginosa* y de *S. aureus*.

Prueba de susceptibilidad microbiana ante los productos naturales, difusión en agar modificado con pozos.

Se prepararon placas de Petri con una base delgada de agar Müeller-Hinton de 5mm por triplicado para cada cepa a evaluar; una vez solidificado se colocaron 5 cilindros de acero estériles. Se inoculó 2% (180 μ L) de la suspensión bacteriana 0,5 McFarland obtenida en el paso anterior, en tubos de 12 mL de agar Müeller-Hinton fundido y temperado a 45°C, se homogenizó y se vertió sobre las placas que contenían los cilindros dejando solidificar para luego retirar los cilindros de acero.

Se dispensaron 10 μ L de los agentes antimicrobianos a estudiar en las placas con pozos obtenidas previamente tal como lo describe la Figura 1 y se dejaron reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente (imagen 5). Se incubaron a 35°C en aerobiosis sin invertir durante 6 horas para luego invertirlas e incubarlas a 35°C, hasta completar las 24 horas. Finalmente, se observó el efecto antibacterial evidenciando la presencia de halos de inhibición y realizando su medida con ayuda de un vernier, por reverso de las placas, tal como se evidencia en la imagen 6. Los valores obtenidos se compararon con la escala de Durafford⁵⁰. El procedimiento anterior se realizó en placas separadas para el ácido acético, pues al ser éste un compuesto volátil podía comprometer el experimento si se probaba su actividad en la misma placa junto al resto de las sustancias.

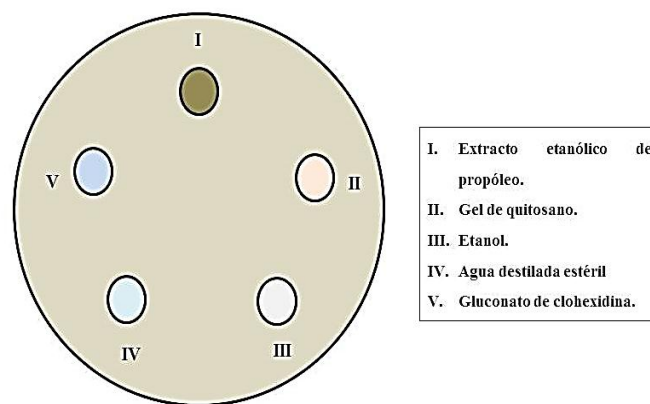


Figura 1. Distribución de los agentes antimicrobianos en evaluación y los controles en la placa de agar Müeller-Hinton con pozos.



Imagen 5 a) Se observa la incorporación de la TP al pozo del agar. b) Placas de Petri por triplicado para cada cepa en estudio, inoculadas con la bacteria y los antimicrobianos en cada pozo.



Imagen 6 Medición de halos inhibitorios al reverso de la placa de *S. aureus* con vernier.

Fase II:

Prueba para determinar la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) del extracto etanólico de propóleo.

Basados en los resultados de las pruebas preliminares de susceptibilidad microbiana, se seleccionaron las bacterias que presentaron susceptibilidad a la tintura de propóleo (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212) para determinar la CIM. Se empleó el método de macrodilución en caldo, para este ensayo, se preparó una solución madre (Stock) de la tintura de propóleo para cada cepa (1280µg/mL). Se estableció el rango de trabajo de diluciones para cada extracto,

tomando en cuenta la concentración utilizada en la prueba preliminar, seleccionándose el rango mínimo 1 µg/mL y máximo 128 µg/mL (1; 2; 4; 8; 16; 32; 64 y 128 µg/mL). Adicionalmente se prepararon tubos con CHX como control positivo y agua destilada como control negativo, realizando el ensayo por triplicado. Para la obtención de dichas concentraciones, se rotularon cuidadosamente cada uno de los tubos y se siguió el procedimiento sugerido por el CLSI⁹⁹(imagen 7).

Tabla 1. Esquema para la preparación de las diluciones de agentes antimicrobianos para ser utilizados en las pruebas de susceptibilidad CIM en caldo.

Paso	Concentración (µg/ml)	Fuente	Volumen (ml)	Caldo MHI (ml)	Concentración final (µg/ml)
1	5120	Stock	1	9	512
2	512	Paso 1	2	2	256
3	512	Paso 1	1	3	128
4	512	Paso 1	1	7	64
5	64	Paso 4	2	2	32
6	64	Paso 4	1	3	16
7	64	Paso 4	1	7	8
8	8	Paso 7	2	2	4
9	8	Paso 7	1	3	2
10	8	Paso 7	1	7	1
11	1	Paso 10	2	2	0.5
12	1	Paso 10	1	3	0.25
13	1	Paso 10	1	7	0.125

Nota: mezclar con vortex al ir realizado cada dilución. Recuerde rotular el tubo con la concentración del antibiótico.

Imagen 7 Traducción del esquema para la preparación de las diluciones de agentes antimicrobianos para ser utilizados en las pruebas de susceptibilidad CIM en caldo. Tomada del Estándar M100 del CLSI⁹⁹.

Por otra parte, a partir de cepas puras y frescas de 24 horas de incubación se prepararon suspensiones concentradas en Solución Salina Fisiológica Estéril (SSFE), las cuales fueron ajustadas al patrón 0,5 McFarland, seguidamente se realizó una dilución 1:10 (9 mL de SSFE + 1 mL del inóculo 0,5 McFarland). Ésta dilución debió realizarse para cada una de las cepas a evaluar. Todos los tubos suplementados con propóleo fueron inoculados con 1 mL de la dilución 1:10 del inóculo bacteriano, seguidamente se homogenizaron y se incubaron a 37°C durante 24 h. La CIM correspondió al tubo de la menor concentración donde no se observó aumento de la turbidez en cualquiera de los triplicados (imagen 8) y se registró en el instrumento de recolección de datos diseñado para el estudio.

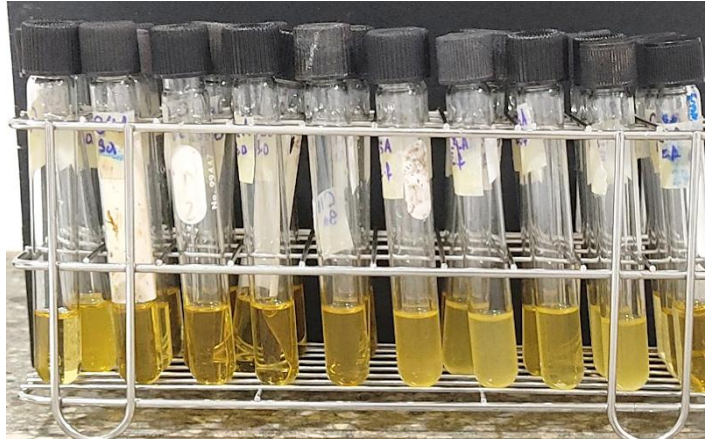


Imagen 8. Determinación de la CIM de la TP para cada cepa bacteriana estudiada en la fase 2, a través del método de turbidimetría.

Fase III:

Prueba de susceptibilidad microbiana ante una membrana de quitosano/propóleo.

En función de la CIM determinada se procedió a diseñar las membranas. Para lo cual 1 mL del gel ácido de quitosano al 5% fue colocado en placas plásticas y se adicionó el volumen equivalente de tintura de propóleo para alcanzar las concentraciones deseadas (tabla 2). La sustancia obtenida fue mezclada hasta homogeneizar, luego las placas plásticas fueron llevadas a una estufa de calor seco a 55°C durante 16 horas con la finalidad de evaporar completamente la fase líquida y obtener finalmente una película de quitosano/propóleo. Las membranas fueron removidas manualmente de las placas plásticas, se recortaron en tamaños de 2 mm x 2 mm y se sometieron a una esterilización con luz ultravioleta.

Tabla 2 Fórmula para la preparación de las membranas de quitosano/propóleo.

	Volumen de gel de quitosano 5%	Volumen tintura de propóleo 45%	Concentración de la membrana Q/P
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	1 mL	284 μ L	128 μ g/mL
	1 mL	568 μ L	256 μ g/mL
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	1 mL	35,5 μ L	16 μ g/mL
	1 mL	71,1 μ L	32 μ g/mL



Imagen 9 Preparación de membranas de quitosano/propóleo. Colocación de quitosano gel en las placas plásticas.



Imagen 10 Aplicación del volumen equivalente a la CIM de propóleo al gel de quitosano.

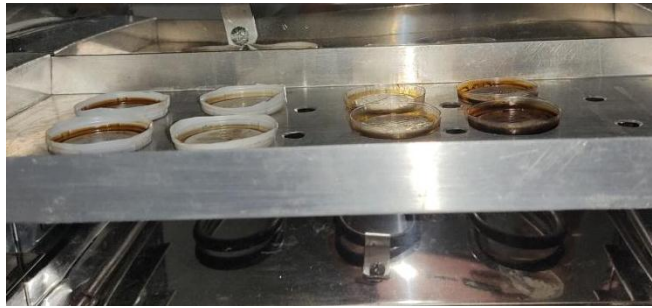


Imagen 11 Introducción de la solución quitosano/propóleo a la estufa de calor seco



Imagen 12 Membranas de quitosano/propóleo.

Por último, siguiendo la metodología de la técnica de difusión en agar. Tres placas de agar Müeller-Hinton fueron inoculadas en superficie haciendo uso de un hisopo estéril, a partir de una suspensión estandarizada al 0,5 McFarland de la bacteria a ensayar. Seguidamente se colocaron en la superficie del agar, las membranas de quitosano/propóleo elaboradas para cada bacteriana, haciendo ligera presión para garantizar un contacto adecuado con el medio de cultivo. Las membranas se situaron a 15 mm o más del borde de la placa de Petri y entre ellas, a fin de no producir ninguna interferencia entre los halos de inhibición, se dejaron reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se incubaron a 35°C en aerobiosis sin invertir durante 6 horas para luego invertirlas e incubarlas a 35°C, hasta completar las 24 horas. Se utilizó gluconato de clorhexidina al 0,12 % como control positivo y agua destilada estéril como control negativo. Transcurrido el tiempo de incubación se realizó la lectura y medida de los halos de inhibición al reverso de las

placas de Petri a las 24 horas, empleando un vernier, dichos valores estuvieron sujetos a la escala de Duraffourd⁵⁰.



Imagen 13 Aplicación de las membranas quitosano/propóleo a los medios para la prueba antimicrobiana.

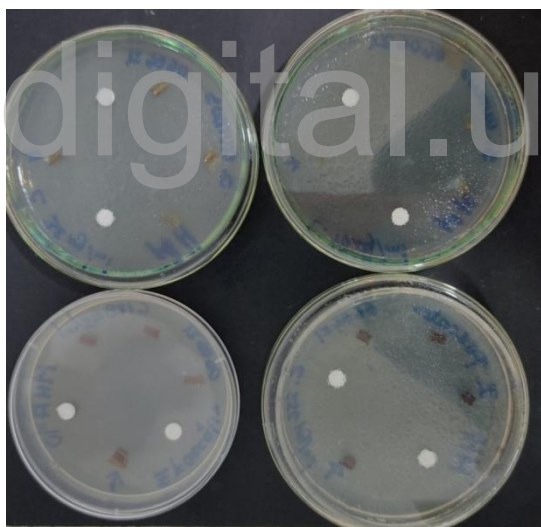


Imagen 14 Placas inoculadas con *E. faecalis* y *S. aureus* por separado, más membranas de quitosano/propóleo y controles positivo y negativo.

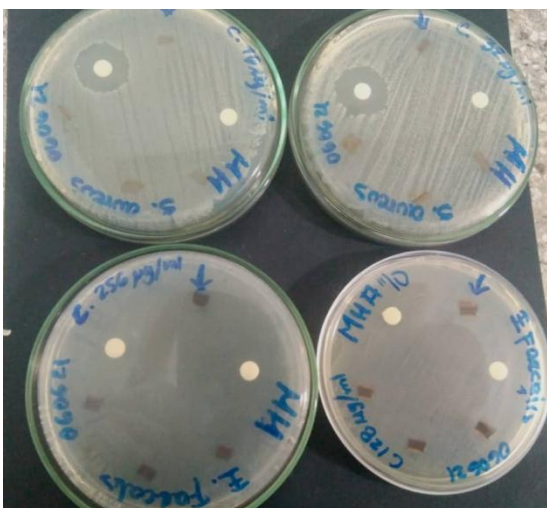


Imagen 15 Placas de la Fase III luego de incubar 24 horas para la medida de halos inhibitorios.

1.11 Principios éticos.

Se realizó un protocolo compuesto de una búsqueda exhaustiva de información bajo la supervisión de personas con experiencia en el área, con el objetivo de obtener resultados confiables, respetando la integridad de los mismos y así, evitar conflictos de interés en el proceso.

1.12 Plan de análisis de resultados.

El comportamiento de las variables cuantitativas y cualitativas de este estudio se describió a través de tablas y gráficos.

Para describir la susceptibilidad a los antimicrobianos, se realizó una medida de tendencia central y dispersión entre los datos cuantitativos de los sub indicadores según la escala de Duraffourd comparando la medición a las 24 horas y a las 48 horas. Los datos se expresaron en tablas simples y gráficos de barra.

Se empleó estadística descriptiva para plasmar cada uno de los resultados en relación a la CIM de la tintura de propóleo determinada por bacteria y sus controles. Los datos de ésta variable cualitativa y sus indicadores en cuanto a presencia y ausencia de turbidez se reflejaron en tablas simples. Para ésta variable cualitativa no se empleó análisis ni prueba estadística.

Finalmente para determinar la susceptibilidad de la membrana de quitosano/propóleo en los dos tiempos de toma de registro se estableció la frecuencia entre los sub indicadores de la escala de Duraffourd al analizar cuánta inhibición nula, sensible, intermedia o sumamente sensible presentaron las bacterias y sus triplicados. Los datos se reflejaron en tablas simples.

Los datos cuantitativos se presentaron con medidas de tendencia central y dispersión (media y desviación estándar). La diferencia de medias entre las variables cuantitativas en la prueba de susceptibilidad a los antimicrobianos y la prueba de susceptibilidad de las membranas de quitosano/propóleo sobre las cepas en estudio se determinó con la prueba T de Student.

Los análisis estadísticos y los gráficos se realizaron con el programa GraphPad Prism versión 5 (GraphPad Software Inc, La Jolla, USA). Por su parte las tablas se realizaron con el software Microsoft Excel.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

1.13 Fase I. Prueba de susceptibilidad microbiana.

La tabla 3 exhibe los resultados preliminares de actividad antibacteriana de la tintura de propóleo al 45% sobre las cepas en estudio. Al comparar los resultados obtenidos con la escala de Duraffourd se puede observar que *Staphylococcus aureus* fue la cepa bacteriana más susceptible seguida de *Enterococcus faecalis* cuyos halos mostraron una susceptibilidad límite a las 24 horas que varió a susceptibilidad media luego de 48 horas y en el caso de *P. aeruginosa* no se observó efecto antibacteriano. Cabe destacar que los halos de inhibición exhibidos por *Staphylococcus aureus* y *Enterococcus faecalis* (luego de 48 horas) fueron comparables con los del control positivo (gluconato de clorhexidina), mientras que para *Pseudomonas aeruginosa* la susceptibilidad estuvo al límite.

No se observó efecto inhibitor en las cepas por parte del gel de quitosano, ni del etanol utilizados como excipientes en este estudio.

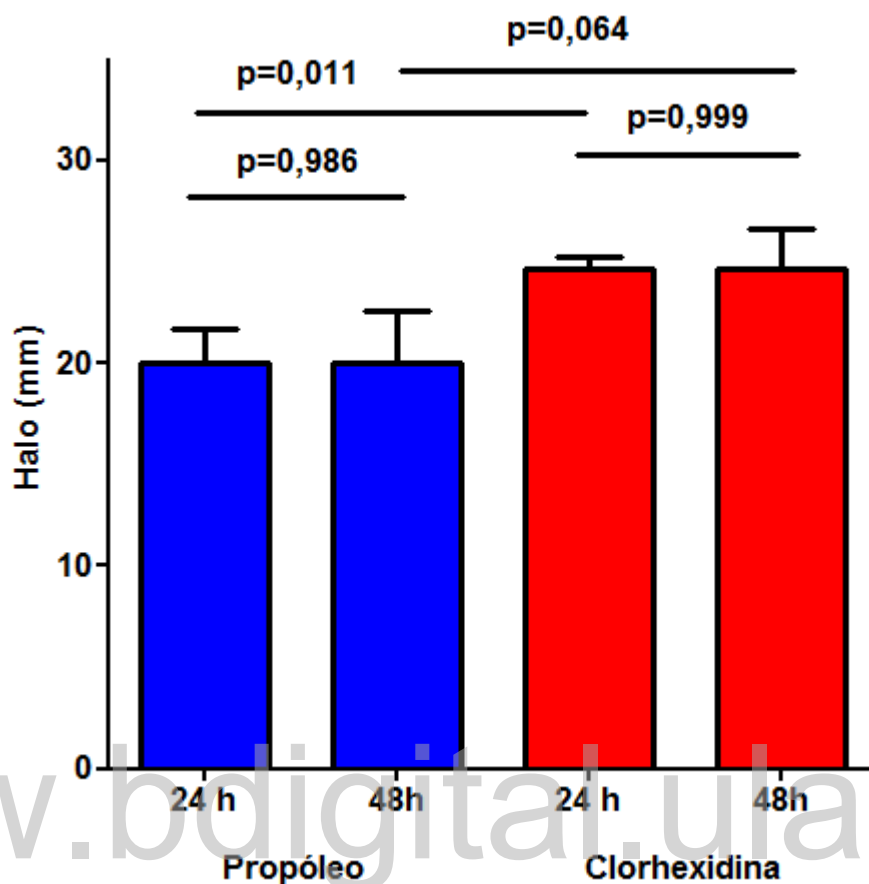
Tabla 3 Prueba de sensibilidad de la tintura de propóleo en los microorganismos evaluados.

		Propóleo	Clorhexidina
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	24 h	20 ± 1,7 (19) Sumamente sensible	24,7 ± 0,6 (25) Sumamente sensible
	48 h	20 ± 2,5 (19,9) Sumamente sensible	24,7 ± 1,9 (25,3) Sumamente sensible
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	24 h	13 ± 0,1 (13) Sensibilidad limite	15,3 ± 0,3 (15,2) Sensibilidad media
	48 h	14 ± 1,2 (13,5) Sensibilidad media	15,1 ± 1,1 (15,6) Sensibilidad media
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	24 h	-	10,5 ± 0,6 (10,4) Sensibilidad limite
	48 h	-	10,5 ± 1,2 (10,8) Sensibilidad limite

Se muestra la media ± desviación estándar y la mediana (entre paréntesis).

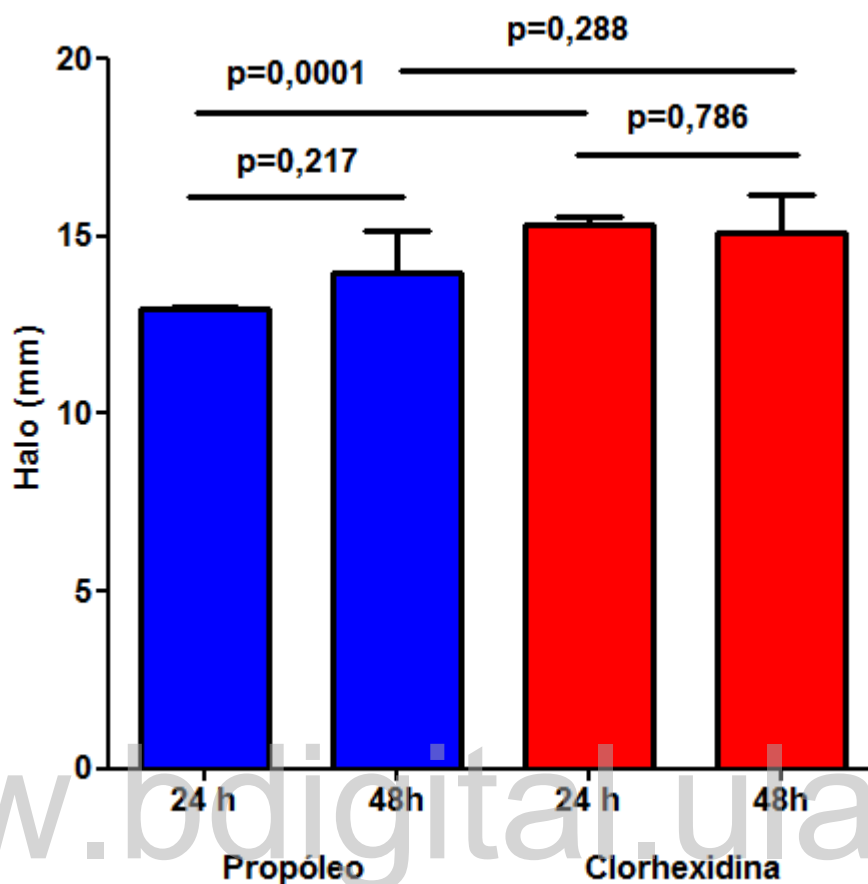
Es importante aclarar que, con respecto a la escala de Duraffourd, los resultados plasmados en la tabla se ciñen a la bibliografía consultada que indica el uso del término sensibilidad, sin embargo, el termino adecuado es susceptibilidad⁹⁹.

Existe una diferencia estadísticamente significativa entre la susceptibilidad que demostró *S. aureus* hacia el propóleo con respecto a la que presentó hacia el control positivo tanto a las 24 horas como a las 48 horas tal como se evidencia en la gráfica 1.



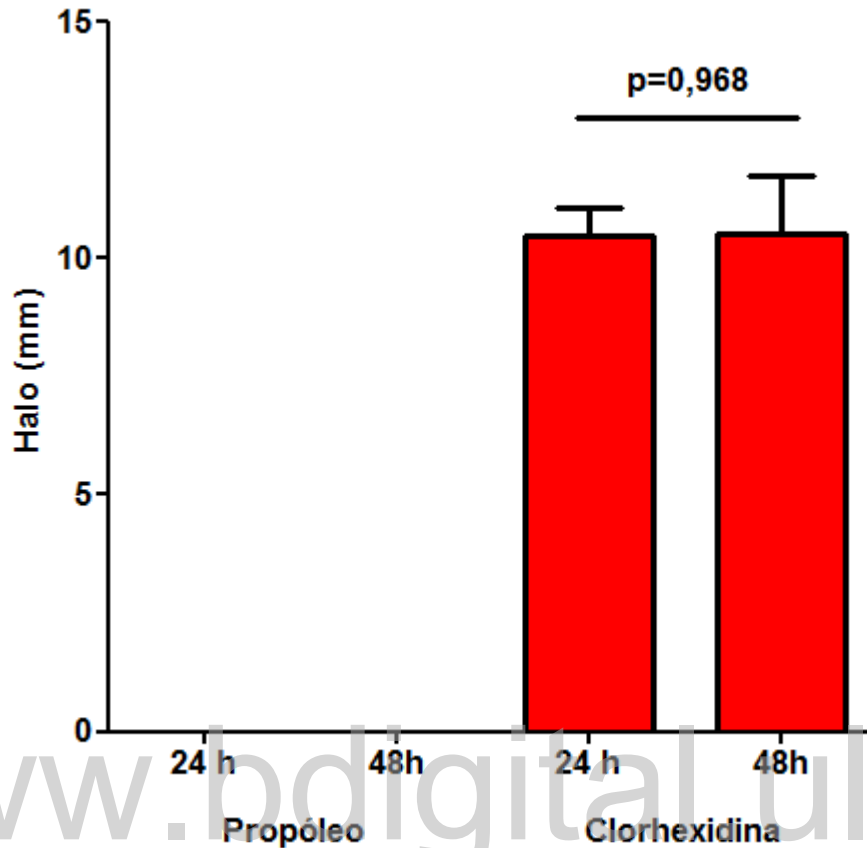
Gráfica 1 Prueba de susceptibilidad del extracto de propóleo sobre *S. aureus* ATCC 25923. Las barras muestran la media \pm desviación estándar (dispersión). Se indican los valores de p. La significancia estadística se evaluó con la prueba T de Student, Se consideraron significativos los valores de $p < 0,05$.

En el gráfico de barras (grafica 2) que expresa la comparación en la medida en milímetros de la tintura de propóleo y clorhexidina sobre *E. faecalis*, se establece que no existe diferencia significativa entre los valores de los halos tomados a las 24h y 48h para la TP pues ambas medidas se hallaron dentro de la susceptibilidad limite, así como el control positivo cuyas medidas se mantuvieron en el rango de susceptibilidad media; sin embargo entre los valores de los halos inhibitorios de cada sustancia tomados a las 24 horas se establece una diferencia significativa donde $p=0,0001$ ya que la tintura de propóleo demostró una susceptibilidad limite y el control positivo susceptibilidad media respectivamente.



Gráfica 2 Prueba de susceptibilidad del extracto de propóleo sobre *E. faecalis* ATCC 29212 . Las barras muestran la media \pm desviación estándar (dispersión). Se indican los valores de p. La significancia estadística se evaluó con la prueba T de Student, Se consideraron significativos los valores de $p < 0,05$.

Finalmente la gráfica 3 evidencia la ausencia de susceptibilidad antimicrobiana por parte de *Pseudomonas aeruginosa*, así como también se aprecia que los valores obtenidos por parte del control positivo no presentaron diferencia significativa a las 24h y a las 48 horas pues no variaron notablemente.



Gráfica 3 Prueba de susceptibilidad del extracto de propóleo sobre *P. aeruginosa* ATCC 27853. Las barras muestran la media \pm desviación estándar (dispersión). Se indican los valores de p. La significancia estadística se evaluó con la prueba T de Student, Se consideraron significativos los valores de $p < 0,05$.

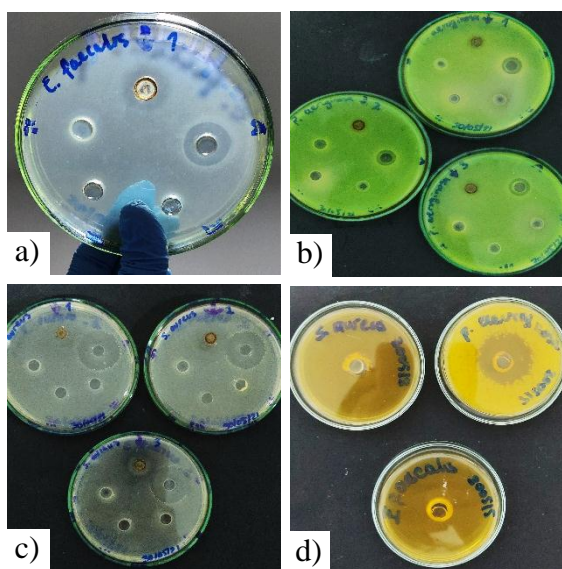


Imagen 16 a) Placa N°1 de *E. faecalis* ATCC 29212 donde se observan halos inhibitorios de la TP y CHX. b) Placas N° 1, 2 y 3 de *P. aeruginosa* ATCC 27853 con sus halos inhibitorios de CHX. c) Placas N° 1, 2 y 3 de *S. aureus* ATCC 25923 con sus halos inhibitorios de TP y CHX. d) Placas control de ácido acético de cada cepa en estudio.

1.14 Fase II: Prueba para determinar la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) del extracto etanólico de propóleo.

Los resultados obtenidos en la prueba preliminar de actividad antibacteriana se confirman al determinar la CIM para las bacterias susceptibles. La tabla 4 muestra una CIM para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 de 8 $\mu\text{g/mL}$ demostrando su gran susceptibilidad a la tintura de propóleo versus una CIM de 128 $\mu\text{g/mL}$ para *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, quien requiere de una mayor concentración de tintura de propóleo para ser inhibido. Es importante resaltar que el gluconato de clorhexidina muestra una gran actividad inhibitoria a bajas concentraciones sobre las bacterias estudiadas.

Tabla 4 Patrón de susceptibilidad de las bacterias evaluadas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212) en función de la concentración de la Tintura de propóleo al 45%.

		128	64	32	16	8	4	2	1
Propoleo	<i>E. faecalis</i>	---	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++
	<i>S. aureus</i>	---	---	---	---	---	+++	+++	+++
Clorhexidina	<i>E. faecalis</i>	---	---	---	---	---	---	+++	+++
	<i>S. aureus</i>	---	---	---	---	---	---	---	---



Imagen 17 Controles positivos y negativos de la fase II.

1.15 Fase III: Prueba de susceptibilidad microbiana ante una membrana de quitosano/propóleo.

Una vez concluido el proceso de determinación de la actividad antibacteriana de una molécula bioactiva, el siguiente paso es la búsqueda de un vehículo manejable, que permita una administración adecuada y garantice la liberación del compuesto y por

ende su actividad. Las membranas de quitosano/propóleo se prepararon siguiendo la metodología indicada y cuidando todas las variables. Sin embargo, al desarrollar la técnica de difusión en agar no pudo evidenciarse la presencia de halos de inhibición en ninguna de las concentraciones de TP ensayadas.

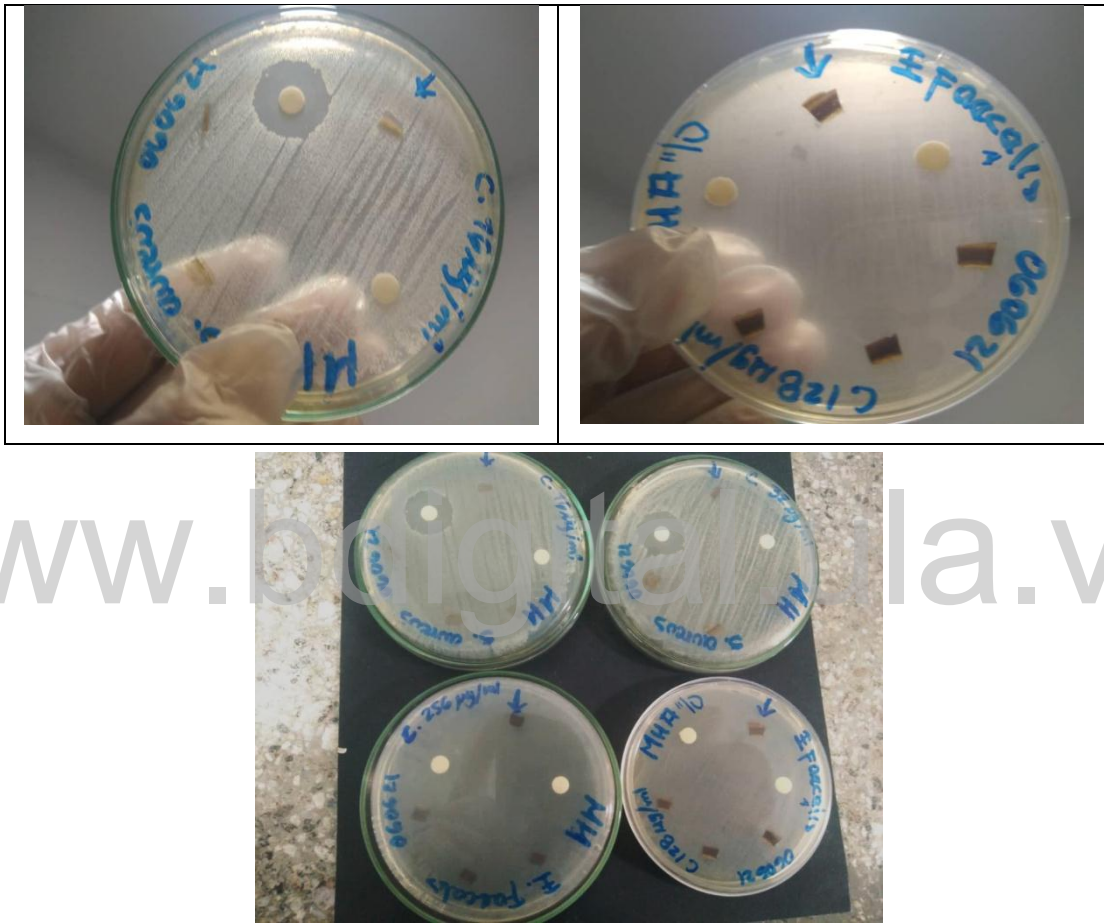


Imagen 18 Prueba de susceptibilidad antimicrobiana de las membranas de quitosano/propóleo.

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN

Se sabe que el uso indiscriminado de los antibióticos produce un incremento en la resistencia bacteriana a los mismos⁵⁶. Dentro de las bacterias patógenas con alta incidencia en la cavidad bucal, que se han convertido en un problema de salud pública por la resistencia a los antibióticos^{56,100} y dificultar el uso de tratamientos convencionales⁵⁴, se encuentran el *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (SARM)⁵⁶, *Enterococcus faecalis* responsable de los fracasos e infecciones en endodoncia^{56,100} y *Pseudomonas aeruginosa* considerada factor agravante de la enfermedad periodontal⁵⁴.

Los resultados obtenidos en la fase I de la presente investigación mostraron que la cepa más susceptible a la tintura de propóleo al 45% fue *S. aureus*, en concordancia con Mayta et al 2010¹⁰¹ quienes determinaron que el extracto etanólico de propóleo presentaba mayor efecto inhibitor sobre cepas de *Staphylococcus aureus*. Por otra parte, Barragán 2015³⁸ al estudiar el efecto antibacteriano *in vitro* de una tintura de propóleo sobre *E. faecalis*, observó una media de halos de 10,18 en contraposición con Infantes 2017¹⁰², cuya investigación demostró resultados mayores con una media de halos de 13,72 siendo éste último un valor cercano al hallado en el presente trabajo, donde la media del halo inhibitorio de la tintura de propóleo fue de 14 demostrando la mayor efectividad de la actividad antimicrobiana de la tintura estudiada sobre dicha bacteria. En el caso de *Pseudomonas aeruginosa*, investigaciones revelan la presencia de inhibición por el antimicrobiano en estudio^{50,103,104}, a diferencia de la susceptibilidad nula encontrada en este trabajo. Lo que nos permite inferir que la tintura de propóleo tiene compuestos bioactivos capaces de afectar de una manera más directa a las estructuras y el metabolismo de

las bacterias Gram positivas respecto a las Gram negativas^{16,22}. Ante los hallazgos reportados en este estudio por una parte, el hecho de que es ampliamente reconocido que la composición del propóleo puede variar dependiendo de muchos factores tales como origen, clima, tipo de abeja^{18,22} y frente a la variabilidad de los resultados presentados en las diferentes investigaciones abordadas. Queda demostrada la necesidad de estudiar y caracterizar los propóleos según las zonas donde se producen.

Con respecto a los resultados de clorhexidina al 0,12% en la primera fase, se observó que al igual que Tapia 2018⁴⁰ el gluconato de clorhexidina al 0,12% posee mayor actividad antibacteriana que el extracto etanólico de propóleo, siendo el evaluado por esta autora al 30%. En contraposición a los resultados de Mayta et al 2010¹⁰¹, quienes observaron halos de inhibición menores a los obtenidos en la tintura de propóleo sobre *S. aureus* ATCC 25923. Es importante señalar que para obtener la tintura o extracto etanólico de propóleo, se requiere el uso del Etanol al 99% como diluyente. Conociendo sus propiedades antimicrobianas, se evaluó su inocuidad sobre las bacterias objeto de prueba. No obstante, bajo las pruebas realizadas, no se observó tal efecto, por lo cual, la actividad antibacteriana obtenida fue netamente dada por el propóleo, por otra parte Luaces 2017³⁷ estudió la actividad del gel de quitosano sobre *E. faecalis*, hallando una media en el halo inhibitorio de 17,71 resultados que difieren de los obtenidos en el actual estudio, puesto que el gel de quitosano no mostró actividad sobre ninguna de las cepas bacterianas. Cabe destacar que, uno de los ingredientes utilizados para la obtención del gel de quitosano es el Ácido acético glacial (AAG), molécula altamente volátil y bactericida¹⁰⁵. En este estudio se utilizó un gel de quitosano elaborado en noviembre de 2019, lo que podría estar relacionado con la pérdida de la actividad del AAG o de los compuestos activos del quitosano, respecto a lo observado por otros autores quienes elaboraron el gel previo a su evaluación.

Una vez reconocida la actividad antibacteriana de una biomolécula, el paso siguiente es determinar la concentración capaz de inhibir el crecimiento bacteriano,

tal concentración permite establecer una medida que puede ser utilizada en el diseño de productos con fines terapéuticos. Existen diferentes métodos para establecerla, sin embargo, la técnica *gold standard* es la propuesta por el CLSI⁹⁹. En la fase II de este trabajo, se determinó la CIM de la tintura de propóleo para cada cepa en estudio obteniendo así una CIM para *E. faecalis* de 128 µg/mL y para *S. aureus* 16 µg/mL. Datos que difieren de los hallados por Nazeri et al. 2019¹⁰⁶ cuya CIM del extracto etanólico de propóleo para *S. aureus* fue de 150 µg/mL y para *E. faecalis* 300 µg/mL; por su parte, Uzel et al. 2005¹⁰⁷ estudiaron el efecto antimicrobiano del extracto etanólico de 4 tipos de propóleos de diferentes regiones de Asia sobre diferentes grupos de microorganismos incluyendo patógenos bucales, determinaron que las CIM para *S. aureus* fueron 8 µg/mL para 2 tipos de propóleo y 16 µg/mL para los 2 restantes, en *E. faecalis* las CIM se hallaron en 2 µg/mL, 8 µg/mL y 32 µg/mL para los 2 propóleos restantes, de allí se infiere que el propóleo sea cual sea su origen posee la capacidad de inhibir bacterias patógenas en sus diferentes concentraciones siendo esto de gran ayuda en el área de la salud para el tratamiento de patologías de origen bacteriano. En el control positivo, se encontró crecimiento a partir de las concentraciones inferiores a 4 µg/mL para *E. faecalis* mientras que *S. aureus* no se halló en ninguna de las diluciones realizadas, determinando así que la CIM de clorhexidina para *E. faecalis* es de 4 µg/mL y para *S. aureus* <1 µg/mL, todo hecho siguiendo los criterios del CLSI. De esta manera se hallan resultados que difieren de los encontrados por Akca et al.¹⁶ 2016, quienes determinaron que la CIM de la clorhexidina para *S. aureus* fue de 128 µg/mL siendo mayor que la hallada en el presente estudio y menor para *E. faecalis* con 64 µg/mL.

Uno de los grandes retos de la industria farmacéutica está relacionado al diseño de fármacos. La brecha entre los hallazgos y pruebas *in vitro* tanto químicas como bioquímicas; y la incorporación en un vehículo apropiado, inerte, amigable, rentable entre otras características, plantea un proceso de pruebas de ensayo y error que conducen a la estandarización del proceso de producción en masa. Sobre la base de la afirmación anterior, diversos estudios establecen la utilidad del gel de quitosano

como vehículo de biomoléculas¹⁰⁸, en este estudio, se elaboraron membranas de quitosano con las concentraciones de propóleo establecidas y se evaluaron *in vitro* a través de pruebas microbiológicas, los resultados arrojados por estas pruebas mostraron que no hubo actividad antimicrobiana por las membranas en ninguna de sus concentraciones. Datos similares a los obtenidos por León et al.¹⁰⁹ 2008, donde probaron la actividad antimicrobiana de membranas de quitosano-alcohol polivinílico y extracto etanólico de propóleo sobre cepas de *S. aureus* y *P. aeruginosa*, donde no hallaron halos inhibitorios creados por las membranas. En contraposición, Luaces³⁷ 2007, fabricó un gel de quitosano y extracto etanólico de propóleo en una única concentración el cual probó microbiológicamente contra cepas de *S. aureus* y *E. faecalis* por el medio de difusión de Kirby-Bauer, donde obtuvo halos inhibitorios para ambas bacterias con un diámetro que variaba entre 21 – 30 mm, siendo estos resultados contradictorios con los obtenidos en el presente trabajo. Tales resultados nos permiten inferir que las moléculas bioactivas del propóleo por una parte, se quedan atrapadas dentro de la malla de quitosano y no pueden difundir en el agar o que la técnica de difusión en el agar no provee las condiciones necesarias para favorecer la difusión de la molécula de la membrana al agar. De allí la importancia de probar nuevas técnicas de elaboración del gel de quitosano, así como otras técnicas microbiológicas y biológicas que permitan evidenciar el efecto antibacterial demostrado en la fase I y II de este estudio.

Por último, es muy importante continuar con los estudios de las membranas de quitosano/propóleo como alternativa de uso en odontología ya que ha sido reconocida como un biomaterial; quienes forman parte de la cotidianidad, abarcando aspectos de la química, biología y medicina¹⁰⁸. Son definidos como cualquier sustancia, de origen natural o sintético, utilizadas con el fin de tratar, aumentar o sustituir algún tejido, órgano o función del cuerpo humano^{42,108}, como autoinjertos, aloinjertos o xenoinjertos en materiales de trasplante, implantes dentales, tejido artificial, entre otros¹⁰⁸, poseen gran cantidad de propiedades biológicas como la biocompatibilidad, biodegradación²⁹ y acción antimicrobiana¹⁸. Una de sus más importantes aplicaciones

es la capacidad de brindar alivio a pacientes a partir de la descarga prolongada de fármacos durante cierto tiempo¹⁰⁸.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

1.16 Conclusiones

- Se logró demostrar la actividad antibacteriana de la tintura de propóleo al 45% sobre dos de las tres bacterias propuestas en esta investigación.
- El gel de quitosano resultó ser inocuo para las tres bacterias estudiadas.
- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 fue la bacteria más susceptible a la tintura de propóleo con halos de inhibición comparables al control positivo.
- La tintura de propóleo al 45%, no presentó efecto antibacterial sobre *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.
- Se estableció una CIM de propóleo de 8 µg/mL para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y 128 µg/mL para *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.
- No se alcanzó a evidenciar la presencia de actividad antibacteriana sobre las bacterias objeto de estudio, de las membranas de Q/P en las concentraciones ensayadas.

1.17 Recomendaciones

- Elaborar la tintura de propóleo a partir del propóleo crudo certificado a fin de asegurarse de la concentración real del producto.
- Ensayar nuevas técnicas de obtención del gel de quitosano que permitan mejorar la difusión del propóleo a través de la membrana.
- Ampliar el margen de concentraciones a evaluar, partiendo de la premisa de que algunas moléculas bioactivas pueden quedarse atrapadas en la membrana de quitosano.

- Incorporar nuevas especies bacterianas de interés odontológico en el estudio de la actividad antibacteriana del propóleo.

www.bdigital.ula.ve

REFERENCIAS

1. Cujano L. “Estudio in vivo del efecto antimicrobiano del propóleo sobre los microorganismos causantes de la gingivitis”[Tesis] [Internet]. Universidad regional autónoma de los andes; 2016. Disponible en: <http://dspace.uniandes.edu.ec/handle/123456789/4029>
2. Jara R. Evaluación in vitro del efecto antibacteriano de cinco propóleos peruanos sobre cepas de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556)[Tesis] [Internet]. Universidad Peruana de Ciencias Aplicadas; 2014. Disponible en: https://repositorioacademico.upc.edu.pe/bitstream/handle/10757/528160/Tesis_Jara_Muñoz.pdf?sequence=1&isAllowed=y
3. Serrano-Coll H, Sánchez-Jiménez M, Cardona-Castro N. Conocimiento de la microbiota de la cavidad oral a través de la metagenómica. CES Odontol [Internet]. 2015;28(2):7. Disponible en: <http://revistas.ces.edu.co/index.php/odontologia/article/view/3681>
4. Hurtado-Camarena A, Bojórquez-Anaya Y, Montaña-Pérez M, López-Mendoza J. Bacterias asociadas a enfermedades periodontales. Oral [Internet]. 2016;17(54):1374-8. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/oral/ora-2016/ora1654f.pdf>
5. Pimentel-Ramirez E, Castillo-Andamayo D, Quintana-Del Solar M, Mautua-Torres D, Villegas-Vílchez L, Díaz-Santisteban C. Efecto antibacteriano de extractos etanólicos de plantas utilizadas en la tradiciones culinarias andinas sobre microorganismos de la cavidad bucal. Rev Estomatol Hered [Internet]. 2015;25(3):268. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/295891895_Efecto_antibacteriano_de_extractos_etanolicos_de_plantas_utilizadas_en_la_tradiciones_culinarias_andinas_sobre_microorganismos_de_la_cavidad_bucal
6. Pereira-De Carvalho C, De Araújo-Lima E, Dos Santos-Pereira J, Costa-Lima K. Papel de los Staphylococcus spp. en la mucositis oral: revisión de la literatura. Acta Odontol Venez [Internet]. 2011;49(3):1-6. Disponible en:

<https://www.actaodontologica.com/ediciones/2011/3/art-23/#>

7. Cruz-Quintana S, Díaz-Sjostrom P, Arias-Socarrás D, Mazón-Baldeón G. Microbiota de los ecosistemas de la cavidad bucal. Rev Cuba Estomatol [Internet]. 2017;54(1):84-99. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75072017000100008
8. Leo M, Martinez L. Propiedades bioquímicas de membranas de quitosano/propóleo de posible utilidad en la regeneración de tejidos blandos en cavidad bucal. [Tesis]. Universidad de los Andes; 2019.
9. Moeintaghavi A, Arab H, Khajekaramodini M, Hosseini R, Danesteh H, Niknami H. In vitro antimicrobial comparison of chlorhexidine, Persica mouthwash and Miswak extract. J Contemp Dent Pr [Internet]. 2012;13(2):147-52. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22665738>.
10. Jassoma E, Baesa L, Sabbagh H. The antiplaque/anticariogenic efficacy of *Salvadora persica* (Miswak) mouthrinse in comparison to that of chlorhexidine: a systematic review and meta-analysis. BMC Oral Health [Internet]. 2019;19(1):64. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31029127>.
11. Romero M, Papone V, Jiménez C. Gluconato de clorhexidina : seguridad y eficacia como antiséptico en cirugía bucomáxilofacial. Tendencias en Med [Internet]. 2016;25(48):113-21. Disponible en: http://tendenciasenmedicina.com/Imagenes/imagenes48/art_16.pdf
12. López-López J, Pallí-E J, Arisó-C P, Montero-R A, Devesa.A E, Salas-E J. Chitosán más clorhexidina (Bexident®Post) en el control del dolor y la inflamación posoperatoria en implantología oral. Estudio piloto. Av Periodon Implant [Internet]. 2015;27(2):81-9. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=5156921>
13. Hortense S, Carvalho É, De Carvalho F, Rodrigues R, Bastos J, De Magalhães R. Uso da clorexidina como agente preventivo e terapêutico na Odontologia.

- Rev Odontol da UNICID [Internet]. 2010;22(2):178-84. Disponible en: <http://publicacoes.unicid.edu.br/index.php/revistadaodontologia/article/view/414>
14. Kollyavar B, Thakur S, Shettar L. Chlorhexidine : The Gold Standard Mouth Wash. J Pharm Biomed Sci [Internet]. 2016;6(2):106-9. Disponible en: http://lawarencepress.com/ojs/index.php/JPBMS/article/view/59/html_21
 15. Mathur S, Mathur T, Srivastava R, Khatri R. Chlorhexidine: The Gold Standard in Chemical Plaque Control. Natl J Physiol Pharm Pharmacol [Internet]. 2011;1(2):45-50. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/265193587_Chlorhexidine_The_Gold_Standard_in_Chemical_Plaque_Control.
 16. Akca A, Akca G, Topçu F, Macit E, Pıkdöken L, Özgen I. The comparative evaluation of the antimicrobial effect of propolis with chlorhexidine against Oral pathogens: an In vitro study. Biomed Res Int [Internet]. 2016;2016:1-8. Disponible en: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2016/3627463/>.
 17. Dadpe M, Dhore S, Dahake P, Kale Y, Kendre S, Siddiqui A. Evaluation of antimicrobial efficacy of Trachyspermum ammi (Ajwain) oil and chlorhexidine against oral bacteria: an in vitro study. J Indian Soc Pedod Prev Dent [Internet]. 2018;36(4):357-63. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30324925>.
 18. Khurshid Z, Naseem M, Zafar M, Najeeb S, Zohaib S. Propolis: a natural biomaterial for dental and oral health care. J Dent Res Dent Clin Dent Prospects [Internet]. 2017;11(4):265-74. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5768961/>
 19. Fernández-Montero G. Uso odontológico de propóleos de origen costarricense. Odontol Vital [Internet]. 2016;1(24):43-52. Disponible en: https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1659-07752016000100043&lng=en&nrm=iso
 20. Wassel M, Khattab M. Antibacterial activity against Streptococcus mutans and inhibition of bacterial induced enamel demineralization of propolis, miswak,

- and chitosan nanoparticles based dental varnishes. *J Adv Res* [Internet]. 2017;8(4):387-92. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jare.2017.05.006>
21. Uğur Z, Akpınar K, Hepokur C, Erdönmez D. Assessment of toxicity and oxidative DNA damage of sodium hypochlorite, chitosan and propolis on fibroblast cells. *Braz Oral Res* [Internet]. 2018;32:e119. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30517428>
 22. Premoli G, Laguado P, Díaz N, Romero C, Villareal J, González A. Uso del Propóleo en Odontología. *Acta Odontol Venez* [Internet]. 2010;48(2):1-13. Disponible en: <https://www.actaodontologica.com/ediciones/2010/2/art-23/>
 23. Jaiswal N, Sinha D, Singh U, Singh K, Jandial U, Goel S. Evaluation of antibacterial efficacy of Chitosan, Chlorhexidine, Propolis and Sodium hypochlorite on *Enterococcus faecalis* biofilm: An in vitro study. *J Clin Exp Dent* [Internet]. 2017;9(9):e1066-74. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29075407>.
 24. Rebaza R, Amaya L, Gutiérrez A, Haro R, Tumbajulca M, Valera F, et al. Aplicación del propóleo en envasado activo. *Agroindustrial Sci* [Internet]. 2016;6(2):239-52. Disponible en: <http://revistas.unitru.edu.pe/index.php/agroindscience/article/view/1281>
 25. Franca J, De Luca M, Ribeiro T, Castilho R, Moreira A, Faraco A, et al. Propolis - based chitosan varnish: drug delivery, controlled release and antimicrobial activity against oral pathogen bacteria. *BMC Complement Altern Med* [Internet]. 2014;14(1):478. Disponible en: <https://bmccomplementmedtherapies.biomedcentral.com/articles/10.1186/1472-6882-14-478>
 26. Ong T, Chitra E, Ramamurthy S, Ling C, Ambu S, Davamani F. Cationic chitosan-propolis nanoparticles alter the zeta potential of *S. Epidermidis*, inhibit biofilm formation by modulating gene expression and exhibit synergism with antibiotics. *PLoS One* [Internet]. 2019;14(2):e0213079. Disponible en: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0213079>

27. Alves S, Amorim C, Sarmiento E, Silva T. Composition and antioxidant activity of geopropolis collected by *Melipona subnitida* (jandaíra) bees. *Evid Based Complement Altern Med* [Internet]. 2013;2013:801383. doi:10.1155/2013/801383. PubMed PMID: 2393. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23935683>.
28. Younes I, Rinaudo M. Chitin and chitosan preparation from marine sources. Structure, properties and applications. *Mar Drugs* [Internet]. 2015;13(3):1133-74. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25738328>.
29. Husain S, Al-Samadani K, Najeeb S, Zafar M, Khurshid Z, Zohaib S, et al. Chitosan biomaterials for current and potential dental applications. *Materials (Basel)* [Internet]. 2017;10(6):602. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5553419/>.
30. Araujo J, Negrón E, Velasco G, Suárez D, González A, Florido R, et al. Estudio comparativo histológico de la eficiencia del xerogel y liposoma a base de Quitosano para el tratamiento de la osteítis alveolar en ratas Wistar. *Rev Eur Odontostomatol* [Internet]. 2015;225:1-14. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/282780061_Estudio_comparativo_histologico_de_la_eficiencia_del_xerogel_y_liposoma_a_base_de_Quitosano_para_el_tratamiento_de_la_osteitis_alveolar_en_ratas_Wistar
31. De Luca M, Franca J, Macedo F, Grenho L, Cortes M, Faraco A, et al. Propolis varnish: antimicrobial properties against cariogenic bacteria, cytotoxicity, and sustained-release profile. *Biomed Res Int* [Internet]. 2014;2014:6. Disponible en: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/348647/>
32. Del Carpio-Perochena A, Monteiro C, Hungaro M, de Moura M, Ahmad F, Kishen A. Chelating and antibacterial properties of chitosan nanoparticles on dentin. *Restor Dent Endod* [Internet]. 2015;40(3):195-201. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4534723/>.
33. Herrera A, Acevedo T, Castro M, Marrugo L. Preparación De Nanopartículas De Quitosano Modificadas Con Alginato De Sodio Con Potencial Para La Liberación Controlada De Medicamentos. *Rev Ing Biomed* [Internet].

- 2016;3(12):75-83. Disponible en:
<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=149247634009>
34. Sánchez Á, Vera-Graziano R, Mñuñoz-Prieto E, Gómez-Pachón E, Bernad-Bernad M, Maciel-Cerda A. Preparación y caracterización de membranas poliméricas electrohiladas de policaprolactona y quitosano para la liberación controlada de clorhidrato de tiamina. *Cienc En Desarro* [Internet]. 2016;7(2):133-51. Disponible en:
http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0121-74882016000200012&script=sci_abstract&tlng=es
35. Ong T, Chitra E, Ramamurthy S, Siddalingam R, Yuen K, Periathamby S, et al. Chitosan-propolis nanoparticle formulation demonstrates anti-bacterial activity against *Enterococcus faecalis* biofilms. *PLoS One* [Internet]. 2017;12(3):e0174888. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28362873>
36. Perchyonok V, Grobler S, Zhang S. IPNs from Cyclodextrin:Chitosan Antioxidants: bonding, bio-adhesion, antioxidant capacity and drug release. *J Funct Biomater* [Internet]. 2014;5(3):183-96. Disponible en:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4192612/>
37. Luaces G. “Acitividad antimicrobiana in vitro del chitosan/propóleo en gel sobre el *Enterococcus faecalis*”. [Tesis] [Internet]. Ecuador: Universidad de Cuenca; 2017. Disponible en:
<http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/28167>
38. Barragan T. Acción antibacteriana de la procaína al 2% más cafeína al 0,25% y del propóleo sobre cepas de *Enterococcus faecalis*, como coadyuvante en la irrigación en el tratamiento de conducto. [Tesis] [Internet]. Quito: Universidad Central del Ecuador; 2015. Disponible en:
<http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/5797>
39. Bucio-Villalobos C, Martínez-Jaime O. Actividad antibacteriana de un extracto acuoso de propóleo del municipio de Irapuato, Guanajuato, México. *Agron Mesoam* [Internet]. 2017;28(1):223-7. Disponible en:

http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1659-13212017000100018&lng=en&nrm=iso

40. Tapia L. Efecto antibacteriano del extracto de propóleo frente al digluconato de clorhexidina al 0.12% como antiséptico bucal in vitro - Huanuco 2017. [Tesis] [Internet]. Perú: Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Huánuco; 2018. Disponible en: https://alicia.concytec.gob.pe/vufind/Record/UDHR_4b0f47be740843fb9423f896c3fcf4d4/Details
41. AL-Ani I, Zimmermann S, Reichling J, Wink M. Antimicrobial activities of European Propolis collected from various geographic origins alone and in combination with antibiotics. *Medicines* [Internet]. 2018;5(1):2. Disponible en: <https://www.mdpi.com/2305-6320/5/1/2/htm>
42. Pereira E. Membranas de quitosana/bioativos naturais com atividade antimicrobiana para tratamento de lesões cutâneas. [Tesis] [Internet]. Brasil: Universidad Federal da Paraíba; 2018. Disponible en: <https://repositorio.ufpb.br/jspui/handle/123456789/13407>
43. Imani Z, Imani Z, Basir L, Shayeste M, Montazeri E, Rakhshan V. Antibacterial effects of chitosan, formocresol and CMCP as pulpectomy medicament on *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus mutans*. *Iran Endod J* [Internet]. 2018;13(3):342-50. Disponible en: <http://europepmc.org/article/MED/30083204>
44. Martínez-Martínez M, Hernandez-Delgadillo R, Abada B, Pineda-Aguilar N, Solís-Soto J, Nakagosh-Cepedai M, et al. Antimicrobial potential of bismuth lipophilic nanoparticles embedded into chitosan-based membrane. *Dent Mater J* [Internet]. 2019;38(4):611-20. Disponible en: https://www.jstage.jst.go.jp/article/dmj/38/4/38_2018-173/_article.
45. Chimenos-Küstner E, Giovannoni ML, Schemel-Suárez M. Disbiosis como factor determinante de enfermedad oral y sistémica: importancia del microbioma. *Med Clin* [Internet]. 2017;149(7):305-9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.medcli.2017.05.036>

46. Escóssia V, Rodrigues C, Silva M, De Góis T, Ferreira E, Ribeiro L. Microorganismos habitantes da cavidade oral e sua relação com patologias orais e sistêmicas: revisão de literatura. Rev Ciências da Saúde Nov Esperança [Internet]. 2018;16(2):91-9. Disponible en: <https://revista.facene.com.br/index.php/revistane/article/view/13>
47. García E, Castellanos Y, González S, Hamdan A, Bustos J. Frecuencia y caracterización de *Staphylococcus spp.* en la mucosa bucal de pacientes diabéticos y no diabéticos. Rev ADM [Internet]. 2018;75(5):255-60. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=83003#:~:text=Resultados%3A La colonización por Staphylococcus,identificó en 69%25 y S.>
48. Sánchez A, Rodríguez L, Cruz C, Pinilla G, Aguilera S. Revisión del efecto del quórum sensing bacteriano de patógenos orales en la formación de biopelículas y su implicación en la respuesta inmune del huésped. Biociencias [Internet]. 2020;3(1):217-29. Disponible en: <https://hemeroteca.unad.edu.co/index.php/Biociencias/article/view/4410/4253>
49. Negroni M. Microbiología estomatológica: fundamentos y guía práctica [Internet]. 2a ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2009. Disponible en: https://www.academia.edu/32562740/Marta_Negroni_Microbiología_estomatológica_fundamentos_y_guía_práctica_Médica_Panamericana_2009_
50. Alayo G. «Efecto in vitro del propóleo sobre *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* comparado con sulfadiazina de plata». [Tesis] [Internet]. Perú: Universidad Nacional de Trujillo; 2013. Disponible en: <https://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/209>
51. Campuzano S, Jiménez L, Hernández D. La formación de biopelículas y la calidad del agua en la consulta odontológica. Nova [Internet]. 2018;16(29):39-49. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/nova/v16n29/1794-2470-nova-16-29-00039.pdf>
52. Pérez D. Resistencia antimicrobiana: evolución y perspectivas actuales ante el enfoque "Una salud". Rev Cuba Med Trop [Internet]. 2017;69(3):1-17.

Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602017000300009

53. Murray P, Rosental K, Pfaller M. Microbiología Médica [Internet]. 7a edición. España: Elsevier España, S.L; 2014. Disponible en: https://www.academia.edu/28415243/Microbiología_Médica_Murray
54. Ferreira S, Cardoso A. Presença de *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonadaceae* na cavidade bucal humana. Rev Odontol UNESP [Internet]. 1998;27(2):473-84. Disponible en: <https://revodontolunesp.com.br/article/5880178a7f8c9d0a098b47a6/pdf/rou-27-2-473.pdf>
55. Paradella T, Koga-ito C, Cardoso A. *Enterococcus faecalis*: considerações clínicas e microbiológicas. Rev Odontol UNESP [Internet]. 2007;36(2):163-8. Disponible en: <https://www.revodontolunesp.com.br/article/588018097f8c9d0a098b4a37>
56. Arevalo C, Serrato J. «Frecuencia de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente y *Enterococcus faecalis* en cavidad oral de pacientes que acuden a la consulta de endodoncia». [Tesis] [Internet]. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana; 2011. Disponible en: <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/8889/tesis825.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
57. Ramírez-Valdez M, Frías-Salcedo A. Frecuencia de uso y tipo de antimicrobianos utilizados en la unidad de especialidades odontológicas en el período comprendido de enero-marzo de 1999. (Estudio proyectivo). Rev Sanid Milit [Internet]. 2000;54(4):195-9. Disponible en: <https://www.imbiomed.com.mx/articulo.php?id=1911>
58. Delgado M. Nivel de conocimiento de los cirujanos dentistas sobre prescripción racional de antimicrobianos en odontología en el distrito de San Martín de Porres, provincia de Lima, departamento de Lima, Perú, 2017. [Tesis] [Internet]. Perú: Universidad Católica los Ángeles Chimbote.; 2018. Disponible en: <http://repositorio.uladech.edu.pe/handle/123456789/2069>

59. Calderón G, Aguilar L. Resistencia antimicrobiana: microorganismos más resistentes y antibióticos con menor actividad. Rev Med Cos Cen [Internet]. 2016;73(621):757-63. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/revmedcoscen/rmc-2016/rmc164c.pdf>
60. Montero-recalde M, Vayas L, Avilés-Esquivel D, Pazmiño P, Erazo-gutierrez V. Evaluación de dos métodos para medir la sensibilidad de inhibición de crecimiento de la cepa certificada de *Staphylococcus aureus subsp . aureus*. 2018;29(4):1543-7. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1609-91172018000400052&lng=es&nrm=iso
61. Rivas C, Oranday M, Verde M. Investigación en plantas de importancia médica [Internet]. México: OmniaScience; 2016. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/316860979_investigacion_en_plantas_de_importancia_medica
62. Monroy-Torres R, Linares- Segovia B, Ramírez-Gómez X. Desarrollo de una técnica para la detección in vitro de la presencia de antibióticos en muestras de hígado de res, cerdo y pollo. Ciencia UAT [Internet]. 2015;9(2):68-73. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S2007-78582015000100068&lng=es&nrm=iso.
63. Ramirez L, Marin D. Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. Sci Tech [Internet]. 2009;15(42):pp.263-268. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/849/84916714049.pdf>
64. Piminchumo V. Efecto de dos colutorios bucales comerciales a base de extractos naturales sobre el índice de higiene oral en pacientes atendidos en el curso de periodoncia de la clínica odontológica de la Universidad Católica los Ángeles de Chimbote, sede Trujillo, 2015 [Internet]. Perú: Universidad Católica los Ángeles de Chimbote; 2019. Disponible en: <http://repositorio.uladech.edu.pe/bitstream/handle/123456789/9343/BUCALE>

S_HIGIENE_PIMINCHUMO_CASTANEDA_VICTOR_HUGO.pdf?sequence=1&isAllowed=y

65. Sinha D, Sinha A. Natural medicaments in dentistry. Ayu [Internet]. 2014;35(2):113-8. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4279314/?report=classic#>
66. Ordóñez L. “Efecto antiséptico y antiinflamatorio del propóleo como agente terapéutico alternativo en pacientes con gingivitis asociada a placa”. [Tesis] [Internet]. Ecuador: Universidad Nacional de Loja; 2019. Disponible en: <http://dspace.unl.edu.ec:9001/jspui/handle/123456789/21953>
67. Tomaszewski M, Dein M, Novy A, Hartman T, Steinhaus M, Luckett C, et al. Quantitation and seasonal variation of key odorants in propolis. J Agric Food Chem [Internet]. 2019;67(5):1495-503. Disponible en: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/acs.jafc.8b05965?rand=b24rf6bu>
68. Mendoza E. Estudio comparativo del efecto antifúngico del extracto etánolico de propóleos de la sierra y costa Liberteña sobre cepas de *Candida albicans* ATCC 10231, Trujillo-2018. [Tesis] [Internet]. Universidad Católica los Ángeles Chimbote; 2019. Disponible en: http://repositorio.uladech.edu.pe/bitstream/handle/123456789/10968/PROPOL EOS_NISTATINA_MENDOZA_CARRANZA_ELVER_MILER.pdf?sequence=1&isAllowed=y
69. Rodríguez B, Canales M, Penieres J, Cruz T. Composición química, propiedades antioxidantes y actividad antimicrobiana de propóleos mexicanos. Acta Univ [Internet]. 2020;30. Disponible en: <http://www.actauniversitaria.ugto.mx/index.php/acta/article/view/2435>
70. Cuenca A, Machare Y. Comparación química de muestras de propóleos ecuatorianos procedentes de Azuay. [Tesis] [Internet]. Machala: Universidad técnica de Machala; 2019. Disponible en: <http://repositorio.utmachala.edu.ec/handle/48000/14138>
71. López N, Aymar J, Lezcano M, Mandri M, Gili M, Zamudio M. Utilización del Propóleos en Odontología. Rev Ateneo Argent Odontol [Internet].

- 2016;55(2):19-22. Disponible en:
<https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-869394?lang=es>
72. Delgado M, Andrade J, Ramírez C. Caracterización fisicoquímica de propóleos colectados en el Bosque La Primavera Zapopan, Jalisco. *Rev Mex Cienc [Internet]*. 2018;6(28):74-87. Disponible en:
https://www.researchgate.net/publication/323952033_Caracterizacion_fisicoquimica_de_propoleos_colectados_en_el_Bosque_La_Primavera_Zapopan_Jalisco/fulltext/5ab4516baca272171003cf47/Caracterizacion-fisicoquimica-de-propoleos-colectados-en-el-Bosque-La-Primavera-Zapopan-Jalisco.pdf
73. Seibert J, Bautista-Silva J, Amparo T, Petit A, Pervier P, dos Santos J, et al. Development of propolis nanoemulsion with antioxidant and antimicrobial activity for use as a potential natural preservative. *Food Chem [Internet]*. 2019;287:61-7. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.02.078>
74. Fernández S, Alemán E, García B, Goienetxe E, Olaguibel J, Tabar A. Direct and airborne contact dermatitis from propolis in beekeepers. *Contact Dermatitis [Internet]*. 2004;50(5):320-1. Disponible en:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.0105-1873.2004.00341g.x>
75. Machado O, García A, Rosales Y, Mawad M, Fontaine M. Efectividad de la tintura de propóleo al 5 % en el tratamiento de la gingivitis descamativa crónica. *Rev Electrónica Dr Zoilo E Mar Vidaurreta [Internet]*. 2015;40(9). Disponible en:
http://revzoilomarinello.sld.cu/index.php/zmv/article/view/314/pdf_52
76. Aguirre N. Acción antimicrobiana para inhibir el *Enterococcus faecalis*: análisis in vitro de dos medicamentos de uso externo, Paramonoclorofenol y Propóleo. [Tesis] [Internet]. Quito: Universidad Central del Ecuador; 2015. Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/3755/1/T-UC-0015-117.pdf>
77. Quadri F, Warhadpande M. Non-surgical endodontic retreatment of extra-oral cutaneous sinus using propolis as an intracanal medicament: a case report [Internet]. Vol. 5. 2019. p. 140-2. Disponible en:

<https://www.ijohd.org/journal-article-file/9973>

78. Meneses I, Sampaio G, De Carvalho F, Carlo H, Münchow E, Pithon M, et al. In Vivo biocompatibility, mechanical, and antibacterial properties of cements modified with Propolis in different concentrations. *Eur J Dent* [Internet]. 2020;14(1):77-84. Disponible en: <https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/html/10.1055/s-0040-1702255>
79. Vilaseca C, Bravo R, Paredes M, Salazar E. Eficacia del extracto de propóleo *Apis mellífera* sobre *Candida albicans* en pacientes atendidos en la clínica de prostodoncia de la facultad de Odontología. *Odontociencia* [Internet]. 2019;2(1). Disponible en: <https://usfx.bo/facultades/odontologia/documento/Revista Odontocinecia.pdf>
80. Maity S, Priyadarshini V, Basavaraju S. A comparative evaluation of propolis and light-cured ormocer-based desensitizer in reducing dentin hypersensitivity. *J Indian Soc Periodontol* [Internet]. 2020;24(5):441–446. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7592609/>
81. Cosola S, Giammarinaro E, Marconcini S, Lelli M, Lorenzi C, Genovesi A. Prevention of bacterial colonization on suture threads after oral surgery: comparison between propolis- and chlorhexidine-based formulae. *J Biol Regul Homeost Agents* [Internet]. 2019;33(4):1275-82. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31298019/>
82. Fidoski J, Benedetti A, Kirkov A, Iliev A, Stamatovski A, Baftijari D. Nano-emulsion complex (propolis and vitamin C) promotes wound healing in the oral mucosa. *Oral Maxillofac Pathol J* [Internet]. 2020;11(1):1-5. Disponible en: <https://ompj.org/files/1-39413a784ed5cb3500d79c9d5fb226fe82013495.pdf>
83. Morin-Crini N, Lichtfouse E, Torri G, Crini G. Fundamentals and Applications of Chitosan. En: *Chitin and Chitosan: History, Fundamentals and Innovations* [Internet]. 1st ed. 2019. p. 49-123. Disponible en: <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-02152878/document>
84. Crini G. Historical review on chitin and chitosan biopolymers. *Env Chem Lett*

- [Internet]. 2019;1623-43. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s10311-019-00901-0>
85. Burillo J, González J, Piñón I. Evolución del uso del quitosano en el tratamiento de agua. *finguach* [Internet]. 2019;6(21):6,7. Disponible en: <https://vocero.uach.mx/index.php/finguach/article/view/414>
 86. Rodríguez M. Adsorción de metales pesados mediante biocompositos con base en quitina de diferentes grados de acetilación. [Tesis] [Internet]. México: Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.; 2011. Disponible en: <https://ipicyt.repositorioinstitucional.mx/jspui/bitstream/1010/619/3/TMIPICY-TR6A32011.pdf>
 87. Periyah M, Halim A, Saad A. Chitosan: A promising marine polysaccharide for biomedical research. *Pharmacogn Rev* [Internet]. 2016;10(19):39-42. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4791986/>
 88. Arias-Andrade Y, Veloza L, Sepúlveda-Arias J. Nanocompuestos de Quitosano aplicados al campo de la medicina regenerativa. Una Revisión Sistemática. *Sci Tech* [Internet]. 2020;25(04):604-15. Disponible en: <https://revistas.utp.edu.co/index.php/revistaciencia/article/view/23411>
 89. Espinosa-Cavazos K, Sáenz-Galindo A, Castañeda-Facio A. Películas de quitosano propiedades y aplicaciones. *Afinidad* [Internet]. 2020;77(591). Disponible en: <https://www.raco.cat/index.php/afinidad/article/view/377418>
 90. Quihui-Cota L, Morales-Figueroa G, Valbuena-Gregorio E, Campos-garcía J, Silva-Beltrán N, López-Mata M. Membrana de Quitosano con aceites esenciales de romero y árbol de té: potencial como biomaterial. *Rev Mex Ing Biomédica* [Internet]. 2017;38(1):255-64. Disponible en: <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmib/v38n1/2395-9126-rmib-38-01-255.pdf>
 91. Jiménez R, Arceo M, Loeza P. Quitosano: actividad antimicrobiana y mecanismos de acción. *E-Cuba* [Internet]. 2018;5(9):17-23. Disponible en: <http://e-cucba.cucba.udg.mx/index.php/e-Cucba/article/view/98/96>
 92. Gavhane N, Gurav S, Yadav V. Chitosan and Its Applications : A Review of

- Literature. Value Heal [Internet]. 2013;4(1):1-27. Disponible en: <https://www.yumpu.com/en/document/view/50339453/chitosan-and-its-applications-a-review-of-literature-international->
93. Kmiec M, Pighinelli L, Silva M, Dos Reis V. Chitosan-Properties and applications in dentistry. Adv Tissue Eng Regen Med Open Access [Internet]. 2017;2(4):205–211. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/317411822_Chitosan-Properties_and_Applications_in_Dentistry
94. Zhang C, Hui D, Du C, Sun H, Peng W, Pu X, et al. Preparation and application of chitosan biomaterials in dentistry. Int J Biol Macromol [Internet]. 2020;167:1198–1210. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0141813020349990?via%3Dihub>
95. García E. Preparación y caracterización de membranas semipermeables basadas en quitosano. [Tesis] [Internet]. Mérida: Universidad de los Andes; 2020. Disponible en: https://www.researchgate.net/profile/Cristobal-Larez-Velasquez/publication/341772099_Preparacion_y_caracterizacion_de_membranas_semipermeables_basadas_en_quitosano/links/5ed3122c299bf1c67d2cb08e/Preparacion-y-caracterizacion-de-membranas-semipermeables-ba
96. Cavalcante K, Carvalho T, Nery M, Vinicius M, Ferreira C, Nalone L, et al. Antibacterial activity of chitosan/collagen membranes containing red propolis extract. Pharmazie [Internet]. 2020;75(2):75-81. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32213238/>
97. Hernández R, Fernández C, Batista M. Metodología de la investigación. [Internet]. 6.^a ed. McGRAW-HILL, editor. México; 2014. Disponible en: <https://www.uca.ac.cr/wp-content/uploads/2017/10/Investigacion.pdf>
98. Paredes A, Ortega O, González A, Bustillos L, Velazco G. Análisis comparativo de la regeneración ósea obtenida con quitosano y plasma rico en fibrina. Acta Odontol Venez [Internet]. 2014;52(2). Disponible en: <https://www.actaodontologica.com/ediciones/2014/2/art-2/#>

99. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. CLSI supplement M100. Clinical and Laboratory Standards Institute [Internet]. 31st ed. 2021. Disponible en: <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m100/>
100. Gutierrez N, Romero C, Yañez F. Estudio de la presencia de *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* en los núcleos elaborados en la clínica odontológica de la Universidad Cooperativa de Colombia sede Villavicencio. [Tesis] [Internet]. Villavicencio: Universidad Cooperativa de Colombia; 2016. Disponible en: https://repository.ucc.edu.co/bitstream/20.500.12494/4825/3/2016_estudio_presencia_enterococcus.pdf
101. Mayta F, Sacsquispe S. Evaluación in vitro del efecto antibacteriano del propóleo de Oxapampa - Perú sobre cultivos de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Revista Estomatológica Herediana [Internet]. 2016;19(2):19-24. Disponible en: <https://www.redalyc.org/comocitar.oa?id=421539355004>
102. Infantes R. “Comparación de la efectividad antimicrobiana del extracto de propóleo comercial vs propóleo de la serranía sobre cultivos de *Enterococcus faecalis*“. [Tesis] [Internet]. Perú: Universidad Católica los ángeles Chimbote; 2017. Disponible en: <http://repositorio.uladech.edu.pe/handle/123456789/4659>
103. Meto A, Colombar B, Meto A, Boaretto G, Pinetti D, Marchetti L, et al. Propolis affects pseudomonas aeruginosa growth, biofilm formation, eDNA release and phenazine production: Potential involvement of polyphenols. Microorganisms [Internet]. 2020;8(2). Disponible en: <https://www.mdpi.com/2076-2607/8/2/243>
104. Gil M, Colarusso V, Ferreira J, Muñoz A, Rojas T, Ochoa G, et al. Efecto de un extracto etanólico de propóleos sobre *Pseudomonas aeruginosa* en estado planctónico y sésil. Rev Salus UC [Internet]. 2016;20(1):27-33. Disponible en: <http://ve.scielo.org/pdf/s/v20n1/art06.pdf>
105. Matiz G, Osorio M, Camacho F, Atencia M, Herazo J. Diseño y evaluación in

- vivo de fórmulas para acné basadas en aceites esenciales de naranja (*Citrus sinensis*), albahaca (*Ocimum basilicum* L) y ácido acético. *Biomedica* [Internet]. 2012;32(1):125-33. Disponible en: <https://revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/614>
106. Nazeri R, Ghaiour M, Abbasi S. Evaluation of antibacterial effect of propolis and its application in mouthwash production. *Front Dent* [Internet]. 2019;16(1):1-12. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6778618/>
107. Uzel A, Sorkun K, O O, Cogulu D, Gencay O, Sali h B. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. *Microbiol Res* [Internet]. 2005;160(2):189-95. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15881836/>
108. Hossain A, Roy S, Guin PS. The Importance of advance biomaterials in modern technology: a review. *J Asian Nat Prod Res* [Internet]. 2017;10(4):441-53. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/318897063_The_Importance_of_Advance_Biomaterials_in_Modern_Technology_A_Review
109. León K, Santiago J. Actividad antimicrobiana de propóleo en solución etanólica y en películas de quitosano-alcohol polivinílico. *Inst Peru Energía Nucl* [Internet]. 2008;7:207-10. Disponible en: http://dspace.ipen.gob.pe/bitstream/ipen/567/1/Pag_207-210_ICT-2007.pdf

APÉNDICE A



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE BIOPATOLOGÍA
MÉRIDA – VENEZUELA

FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS.

TÍTULO DEL TRABAJO ESPECIAL DE GRADO: EFECTO ANTIMICROBIANO DE MEMBRANAS DE QUITOSANO/PROPÓLEO SOBRE BACTERIAS ODONTOPATÓGENAS *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

Autores: Isbel Alejandra Cedillo Medina y Yaneth del Valle Fernández Becerra.

Fecha:

Ítem 1. Prueba de susceptibilidad microbiana.

	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212		<i>S. aureus</i> ATCC 25923		<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	
	24 horas	48 horas	24 horas	48 horas	24 horas	48 horas
PROPÓLEO						
CLOHEXIDINA						
QUITOSANO						
ETANOL						
AGUA DESTILADA						
ÁCIDO ACÉTICO						

Medida en milímetros de los halos de inhibición.

Ítem II. Determinación de concentración mínima inhibitoria de la tintura de Propóleo.

PROPÓLEO

		C1	C2	C3	C4	C5
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	Tubo A					
	Tubo B					
	Tubo C					
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	Tubo A					
	Tubo B					
	Tubo C					
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	Tubo A					
	Tubo B					
	Tubo C					

Presencia o ausencia de Turbidez

www.bdigital.ula.ve

		CLOHEXIDINA					AGUA DESTILADA
		C1	C2	C3	C4	C5	
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212							
<i>S. aureus</i> ATCC 25923							
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853							

Presencia o ausencia de Turbidez.

Ítem III. Determinación de actividad antimicrobiana por medición de halos de inhibición.

	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212		<i>S. aureus</i> ATCC 25923		<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	
	24 horas	48 horas	24 horas	48 horas	24 horas	48 horas
MEMBRANA QUITOSANO/PROPÓLEO						
CLORHEXIDINA						
AGUA DESTILADA						

Medida en milímetros de los halos de inhibición.

www.bdigital.ula.ve