



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Medicina

Especialidad en Odontopediatría

“Evaluación del efecto antibacteriano del extracto etanólico de propóleo a diferentes concentraciones ante *Streptococcus mutans*. Estudio *In vitro*”

**Tesis**

Que como parte de los requisitos para obtener el Diploma de la  
Especialidad en Odontopediatría

**Presenta:**

L.O. Cecilia Castillo Galindo

**Dirigido por:**

Dr. en C. Claudia Verónica Cabeza Cabrera

Centro Universitario, Querétaro, Qro.  
Abril 2021  
México



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Medicina  
Especialidad en Odontopediatría

“Evaluación del efecto antibacteriano del extracto etanólico de propóleo a diferentes concentraciones ante *Streptococcus mutans*. Estudio *In vitro*”

**Tesis**

Que como parte de los requisitos para obtener el Diploma de la  
Especialidad en Odontopediatría

**Presenta:**

L.O. Cecilia Castillo Galindo

**Dirigido por:**

Dr. en C. Claudia Verónica Cabeza Cabrera

Dr. en C. Claudia Verónica Cabeza Cabrera  
Presidente

C.D.E.O Ana Liz Yañez Gutiérrez  
Secretario

C.D.E.O Hector Mancilla Herrera  
Vocal

C.D.E.O Laura Adriana Servín Maxemin  
Suplente

Dr. Rubén Abraham Domínguez Pérez  
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.  
Abril 2021  
México

## Resumen

**Introducción:** La caries dental es un proceso o enfermedad dinámica crónica, que ocurre en la estructura dentaria en contacto con los depósitos microbianos entre los cuales se encuentran principalmente los de *Streptococcus mutans* y que, debido al desequilibrio entre la sustancia dental y el fluido de placa circundante, da como resultado una pérdida de mineral de la superficie dental, cuyo signo es la destrucción localizada de tejidos duros. Recientemente, varios estudios han sugerido la eficacia de los productos naturales, como lo es el propóleo, contra diversos microorganismos patógenos. El propóleo es una resina, de composición compleja, que utilizan las abejas para la construcción, reparación y protección de la colmena. Se ha usado desde la antigüedad con diversas finalidades, actualmente se investiga su aplicación en la industria farmacéutica y alimentaria por sus valiosas cualidades. **Objetivo:** Determinar a qué concentración el extracto etanólico de propóleo produce mayores halos de inhibición, ante *Streptococcus mutans*. **Material y métodos:** Estudio experimental *in-vitro*. El estudio se realizó en cajas Petri con agar TYS20B, inoculadas con *Streptococcus mutans*, el total de la muestra fue de 10 cajas Petri, previo al cultivo se colocaron sensidiscos impregnados de los 3 extractos a sus diferentes concentraciones así como un control positivo y uno negativo, posteriormente se registro la medida de los halos de inhibición generados. Se utilizó para el análisis estadísticos la prueba Kolmogorov-Smirnov la cual determinó una distribución normal, posteriormente los datos se sometieron a la prueba ANOVA y Tukey. **Resultados:** Se demostró la actividad antibacteriana del extracto de propóleo en sus diferentes concentraciones, obteniendo una diferencia estadísticamente significativa del extracto de propóleo al 10% y 30% en comparación al extracto de propóleo al 7%. **Conclusiones:** El extracto de propóleo a sus diferentes concentraciones demostró una actividad antibacteriana en presencia de *Streptococcus mutans*.

**(Palabras clave:** Propóleo, *Streptococcus mutans*, caries, halo inhibición, actividad antibacteriana)

## Summary

**Introduction:** Dental caries is a chronic dynamic process or disease, which occurs in the dental structure in contact with microbial deposits, among which are mainly those of *Streptococcus mutans* and which, due to the imbalance between the dental substance and the plaque fluid the surrounding area results in a loss of mineral from the tooth surface, the sign of which is localized destruction of hard tissues. Recently, several studies have suggested the efficacy of natural products, such as propolis, against various pathogenic microorganisms. Propolis is a resin, with a complex composition, used by bees for the construction, repair and protection of the hive. It has been used since ancient times for various purposes, its application in the pharmaceutical and food industry is currently being investigated for its valuable qualities. **Objective:** To determine at what concentration the ethanolic extract of propolis produces greater inhibition halos, before *Streptococcus mutans*. **Material and methods:** In vitro experimental study. The study was carried out in Petri dishes with TYS20B agar, inoculated with *Streptococcus mutans*, the total sample was 10 Petri dishes, prior to the culture, sensidisks impregnated with the 3 extracts at their different concentrations as well as a positive and a negative control. Subsequently, the measurement of the inhibition halos generated was recorded. The Kolmogorov-Smirnov test was used for statistical analysis, which determined a normal distribution, later the data were subjected to the ANOVA and Tukey test. Obtaining as a statistically significant difference  $p < 0.0001$ . **Results:** The antibacterial activity of the propolis extract was demonstrated in its different concentrations, obtaining a statistically significant difference between the 10% and 30% propolis extract compared to the 7% propolis extract. **Conclusions:** The propolis extract at its different concentrations demonstrated antibacterial activity in the presence of *Streptococcus mutans*.

(**Key words:** Propolis, *Streptococcus mutans*, caries, halo inhibition, antibacterial activity)

## **Dedicatorias**

A mis padres en el cielo, en especial a mi mamá por su amor, paciencia, consejos, su apoyo incondicional, por haberme forjado como la persona que soy en la actualidad, por ser mi maestra más grande e impulsarme siempre a lograr mis anhelos. A Omar, por tu amor y apoyo incondicional en todos los aspectos, por estar conmigo en los momentos más turbulentos de mi vida, por creer en mí y motivarme siempre, haces mis días más felices.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## **Agradecimientos**

Quiero agradecer a Dios por tantas bendiciones en mi vida, a mis padres Elena y Francisco por su amor y la vida tan bonita que compartieron a mi lado, a mi abuela Balbina por amarme y motivarme a crecer, y a Omar por su apoyo en todos los aspectos para cumplir este sueño, por tu amor incondicional siempre.

A mi directora de tesis Dra. Claudia Verónica Cabeza Cabrera que con su paciencia, experiencia, confianza y cariño me guio durante diferentes etapas de mi vida y formación. A la Dra. Ana Liz Yañez Gutiérrez por todo el apoyo, su cariño, enseñanzas, consejos, por creer en mi y por ser una de mis mas grandes fuentes de inspiración.

Al doctor Rubén Abraham Domínguez Pérez por su paciencia, enseñanzas y apoyo incondicional. Al Dr. Hector Mancilla Herrera por sus conocimientos compartidos y su motivación. Al doctor Guillermo Ortiz Villagómez por su apoyo. A la Dra. Laura Servín Maxemin por sus enseñanzas y acompañamiento. A mis compañeros de generación por su motivación y alegría siempre. A la Universidad Autónoma de Querétaro que me ha brindado tantas oportunidades.

## Índice

<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
<b>Resumen</b>	i
<b>Summary</b>	ii
<b>Dedicatorias</b>	iii
<b>Agradecimientos</b>	iv
<b>Índice</b>	v
<b>Índice de cuadros</b>	vii
<b>I. Introducción</b>	1
<b>II. Antecedentes/estado del arte</b>	3
II.1	
<b>III. Fundamentación teórica</b>	6
III.1	
<b>IV. Hipótesis o supuestos</b>	11
<b>V. Objetivos</b>	12
V.1 General	12
V.2 Específicos	12
<b>VI. Material y métodos</b>	13
VI.1 Tipo de investigación	13
VI.2 Población o unidad de análisis	13
VI.3 Muestra y tipo de muestra	13
VI. Técnicas e instrumentos	16
VI. Procedimientos	17
<b>VII. Resultados</b>	23
<b>VIII. Discusión</b>	25
<b>IX. Conclusiones</b>	27
<b>X. Propuestas</b>	28
<b>XI. Bibliografía</b>	29
<b>XII. Anexos</b>	33

## Índice de cuadros

<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
<b>Tabla 1</b>	24
<b>Tabla 2</b>	25

Dirección General de Bibliotecas UAQ



## I. Introducción

Una mala salud bucal puede tener profundas repercusiones en la salud general y en la calidad de vida. La mayoría de los trastornos de salud bucal son prevenibles en gran medida y pueden tratarse en sus etapas iniciales. Dentro de los principales trastornos de la salud bucodental, sigue siendo la caries dental, la enfermedad con mayor prevalencia.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) nos indica que el porcentaje de escolares que presentan procesos cariosos va de 60% a 90% en México. Estudios realizados por la Dirección General de Epidemiología de la Secretaría de Salud reveló que aproximadamente 10 millones de niños entre los dos y cinco años padecen caries, lo que representa un grave problema de salud bucal desde edades tempranas.

Es por ello por lo que en la actualidad se siguen buscando diversas alternativas que complementen los esquemas preventivos para preservar y mejorar la salud bucal, que sean de fácil acceso para la población y menos dañinas, como lo son las sustancias de origen natural. Se observó que el propóleo, una sustancia producida por las abejas, a partir de las resinas de los árboles, la cual es utilizada por las abejas para defensa de la colmena posee propiedades antisépticas, antivirales, antiinflamatorias, entre otras.

Desde la antigüedad, el propóleo se ha utilizado, de forma empírica, en la curación de diversas enfermedades, como lo es el tratamiento de caries e infecciones del sistema respiratorio, por su actividad antiséptica y antibacteriana. Los avances tecnológicos han permitido conocer mejor su composición y descubrir nuevas utilidades en diferentes campos de la medicina.

Se encuentra comercializado en diversas presentaciones para consumo humano como lo son comprimidos, cápsulas, extractos, tinturas, jarabes, pastas dentales, cremas, bálsamos, jabones entre otros. Siendo los extractos los más utilizados.

Conocer el efecto antibacteriano del extracto etanólico de propóleo, y sus concentraciones mas efectivas, va encaminado a la búsqueda de opciones de fácil acceso aprovechando los recursos naturales existentes en nuestra región, para nuestro entorno social mas vulnerable que no cuenta con las posibilidades de recibir un esquema preventivo convencional con los productos existentes en el mercado, comprobando así la gran efectividad de productos vegetales como agentes antimicrobianos en el medio odontológico.

## II. Antecedentes

Ghisalberti (1979) afirmó que el propóleo tiene importantes propiedades farmacológicas y puede usarse para una amplia gama de propósitos como agente antiinflamatorio e hipotensivo, estimulante del sistema inmunológico y agente bacteriostático y bactericida, entre muchos otros usos.

Ikeno et al. (1991) demostraron que el propóleo es particularmente eficaz contra bacterias Gram positivas, como *Staphylococcus aureus* y bacterias Gram negativas como Salmonella. De igual manera confirmaron la eficacia del propóleo para inhibir la actividad de la enzima glicosiltransferasa de los circuitos de *Streptococcus mutans* en estudios *In vivo* e *In vitro*.

Se ha demostrado que los efectos antimicrobianos de algunos compuestos presentes en el propóleo, como el sesquiterpeno tt-farnesol el cual presenta un mayor efecto anti-*Streptococcus mutans*, con concentraciones inhibitorias mínimas (MIC) de 14-28 µg / ml y concentraciones bactericidas mínimas (MBC) de 56-112 g / ml (Koo et al. 2002).

Algunos estudios llevados a cabo con pastas dentales y soluciones para enjuagues bucales que contienen propóleo han mostrado actividades inhibitorias sobre los patógenos orales (Kirbıyık 2004).

El propóleo se ha considerado un buen candidato para un adyuvante en el tratamiento o prevención de muchas enfermedades infecciosas. El propóleos es relativamente no tóxico y muestra una amplia gama de actividad antimicrobiana contra una variedad de bacterias, hongos, parásitos y virus (Freitas et al. 2006).

La actividad biológica del propóleo se asocia frecuentemente con la presencia de compuestos fenólicos, principalmente flavonoides (como flavona (rutina, luteolina), iso-flavona (formononetina, daidzeína), dihidroflavonol (pinobanksin, pi- nobanksin-3-acetato) entre otros. Demostraron que el propóleo

puede reducir la colonización de microorganismos anaerobios facultativos como *Streptococcus mutans*, actuando en la prevención de la caries dental (Daugusch et al. 2008).

Hendi et al. (2011) realizaron un estudio en el que concluyeron que el extracto etanólico de propóleo fue el más activo de todas los extractos que estudiaron, mostrando una zona máxima de inhibición de 30 mm a la concentración del 30% y el valor de MIC fue de 640 µg / ml. *Streptococcus aureus* fue el más sensible al extracto de propóleo en comparación a otras bacterias.

Además de una actividad antimicrobiana, también se han demostrado otras propiedades biológicas y farmacológicas para el propóleo, incluidas las propiedades antiinflamatorias, antitumorales, citotóxicas, hepáticas protectoras, antioxidantes, hematostimuladoras e inmunomoduladoras (Toreti et al. 2013).

Se ha comprobado que dichos compuestos son responsables de diversas propiedades biológicas del propóleo, incluido el efecto antiproliferativo de las células cancerosas y potencial terapéutico contra anaerobios resistentes encontrados en infecciones odontogénicas y enfermedades periodontales (Shabbir et al. 2016).

Airen et al. (2018) llevaron a cabo un estudio para evaluar la eficacia del extracto de propóleo contra *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus acidophilus* mediante el método de difusión de pozos en agar. Se probaron dos tipos de extractos, es decir, extractos etanólicos y de agua, a concentraciones de 5% y 20%. Para corroborar los resultados, se utilizó un control positivo (clorhexidina al 0,2%) y un control negativo (agua destilada). Los resultados del estudio indicaron que las concentraciones de extracto etanólico de propóleo fue mas eficaz para inhibir el crecimiento de *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus acidophilus*. El diámetro medio de la zona de inhibición observada contra *Streptococcus mutans* fue de 10,4 mm al 5% de concentración y de 12,4 mm al 20% de concentración.

Abbasi et al. (2018) realizaron un estudio revisando artículos publicados sobre la eficacia del propóleo en área odontológica reportando con éxito su eficacia para la cicatrización de heridas quirúrgicas, prevención de caries, tratamiento de dentina por hipersensibilidad, tratamiento de úlceras aftosas, como medio de almacenamiento para dientes avulsionados, solución de irrigación del conducto radicular y como enjuague bucal.

Przybyłek et al. (2019) de igual manera realizaron un revisión sistemática sobre los últimos informes científicos en el campo de la actividad antibacteriana de esta sustancia. Analizaron los resultados de los estudios sobre la influencia del propóleo en más de 600 cepas bacterianas. Concluyendo que el propóleo es un importante producto antimicrobiano de las abejas, que actúa tanto contra Gram positivas como Bacterias Gram negativas, aeróbicas y anaeróbicas. La actividad del propóleo depende de la composición química y es diferente en cada país.

### III. Fundamentación teórica

Actualmente la prevención y el control de la caries dental incluyen propuestas de tratamientos no invasivos que no se limitan a una sola técnica. Además de los métodos tradicionales, como el seguimiento periódico, el cepillado con dentífricos que contienen fluoruro, la aplicación tópica de fluoruros, la dieta baja en sacarosa, la colocación de selladores y el enjuague en el hogar con soluciones que contienen flúor, en algunos casos se requiere buscar opciones adicionales para un control más efectivo (Duailibe et al. 2007).

#### Caries dental

Se define a la lesión cariosa como un mecanismo dinámico de desmineralización y remineralización como resultado del metabolismo microbiano agregado sobre la superficie dentaria, en la cual, con el tiempo, puede resultar una pérdida neta de mineral y es posible que posteriormente se forme una cavidad. (Núñez y Bacallao 2010).

Aunque el microbioma dentro de las lesiones de caries es notablemente diverso, las bacterias acidogénicas como *Streptococcus mutans*, una bacteria anaerobia facultativa Gram-positiva, son responsables de esta enfermedad polimicrobiana. El *Streptococcus mutans* desempeña el papel principal en la unión inicial a la superficie del diente y al ensamblaje de la biopelícula al producir abundante glucano insoluble, lo que en última instancia exacerba la virulencia física y bioquímica de la placa dental (Simón-Soro et al. 2015).

El paso más importante para que se produzca la caries, es la adhesión inicial del *Streptococcus mutans* a la superficie del diente. Esta adhesión está mediada por la interacción entre una proteína del microorganismo y algunas de la saliva que son absorbidas por el esmalte dental, y la capacidad de acumulación en la placa, proceso que ocurre cuando el *Streptococcus mutans* produce glucanos solubles e insolubles utilizando las enzimas glucosiltransferasas, a partir de los azúcares de la dieta (Riverón et al. 2006).

El *Streptococcus mutans* obtiene su energía de los alimentos ingeridos, su flexibilidad genética le permite romper toda una amplia gama de hidratos de carbono. Entre las sustancias que aprovecha figuran la glucosa, fructosa, sacarosa, galactosa, maltosa, rafinosa, ribulosa, melibiosa e incluso el almidón. La bacteria fermenta todos estos compuestos al disponer de un batallón de enzimas, proteínas que rompen las moléculas de hidratos de carbono, y los convierte en varios subproductos de su metabolismo, como el etanol o el ácido láctico, todos estos subproductos acidifican el medio bucal, lo que inhibe a las otras bacterias, permitiendo al *Streptococcus mutans* mantener una posición de claro dominio (Kishi et al. 2009).

La inclinación del hombre hacia el aprovechamiento de los productos naturales se ha convertido, en la actualidad, en una opción insuperable para satisfacer las carencias en nutrimentos, o para ser empleados en el tratamiento de diversas enfermedades (Noriega et al. 2014).

Es comprensible que los investigadores estén interesados actualmente en las perspectivas prometedoras que ofrecen las sustancias naturales como el propóleo en alternativas para el control de la enfermedad de caries en términos de respuesta antimicrobiana y menores riesgos asociados (Bozcuk et al. 2004).

### Propóleo

La palabra *propolis* es un término complejo que tiene su origen en dos palabras griegas antiguas: pro ("delante de", "en la entrada a" o "defensa") y polis ("comunidad" o "ciudad") cuyo significado se interpreta como "defensa de la ciudad". Por lo tanto, en la apicultura, su significado se refiere a la protección de la colmena (Toreti et al. 2013).

El propóleo se utilizó especialmente en la antigüedad, en Egipto, era muy conocido por los sacerdotes que habían monopolizado la medicina, la química y el arte de momificar cadáveres. El hecho de que el propóleo también era conocido por los antiguos griegos se demuestra por el significado etimológico de su nombre (Lotfy 2006).

El propóleo es una sustancia resinosa recogida por las abejas obreras (*Apis mellifera*) de la corteza de los árboles y las hojas de las plantas. Las abejas utilizan este material enriquecido en secreciones salivales y enzimáticas como material aislante de construcción en la colmena, así como para mantenerla en buen estado de salud (Hashemi 2016).

Tiene la característica de ser una sustancia resinosa, balsámica, gomosa, de consistencia viscosa y color verde pardo, castaño o incluso negro, con sabor acre, frecuentemente amargo, un olor agradable y dulce. Su color y composición dependen en gran medida de su origen botánico y del tipo de abeja que lo produzca (Londoño Orozco et al. 2008).

Es un producto natural fascinante. Para la producción del propóleo, las abejas cosechan resinas de varias especies de plantas, las mezclan con sus secreciones como cera o saliva y las llevan de regreso a la colonia donde las usan para estrechar la entrada del nido para evitar invasores, el propóleo cubre las paredes de su colmena, es sellante en los agujeros y grietas, funciona como base para colocar nuevos peines y para 'momificar' a los intrusos muertos demasiado pesados para ser retirados de su nido. En general, el propóleos se considera un producto clave para la inmunidad de la colonia de abejas (Papachristoforou et al. 2019).

Como producto natural de la colmena de abejas, los extractos de propóleo se han utilizado tanto interna como externamente durante miles de años como agente curativo en la medicina tradicional. El propóleo muestra una composición química compleja. Sus propiedades biológicas, antibacterianas, antivirales, antifúngicas, entre otras actividades, han atraído el interés de los investigadores (Hendi et al. 2011).

Está compuesto principalmente de resina (50%), cera (30%), aceites esenciales. (10%), polen (5%) y otros compuestos orgánicos (5%). Entre estos compuestos orgánicos, podemos encontrar compuestos y ésteres fenólicos, flavonoides en todas sus formas (flavonoles, flavonas, flavononas,



dihidroflavonoles y chalcones), terpenos, esteroides beta, aldehídos y alcoholes aromáticos, sesquiterpenos y terpenos de estilbeno. Al igual que con la miel, su composición varía con diferentes factores, como la fuente de los exudados, el clima y las condiciones ambientales (Viuda-Martos et al. 2008).

Se han encontrado específicamente en la composición de los extractos de propóleo:

- Doce flavonoides diferentes: pinocembrina, acacetina, crisina, rutina, catequina, naringenina, galangina, luteolina, kaempferol, apigenina, miricetina y quercetina.
- Dos ácidos fenólicos: ácido cinámico y ácido cafeico.
- Un derivado de estilbeno: resveratrol.

A dichos componentes se les atribuyen sus propiedades antibacterianas y antifúngicas (Lotfy 2006).

Los compuestos encontrados en propóleos afectan el crecimiento y la actividad glucosiltransferasa del *Streptococcus mutans*. Se sabe que el propóleo exhibe varias actividades biológicas tales como propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias, anestésicas, citostáticas y cariostáticas. Se ha demostrado su efecto antibacteriano tanto en *Streptococcus* orales aislados como en recuentos bacterianos salivales. El propóleo tiene un efecto sobre la membrana citoplasmática y tiene un efecto inhibitor sobre la motilidad bacteriana y la actividad enzimática. Descompone la pared celular bacteriana, el citoplasma y previene la división celular bacteriana (Mohsin et al. 2015).

### Flavonoides

Los flavonoides son un grupo de sustancias polifenólicas de bajo peso molecular obtenidos de la naturaleza, algunos de ellos son componentes del propóleo y la miel los cuales han sido usados en algunos sistemas tradicionales

de la medicina para el tratamiento de enfermedades infecciosas (Farhadi et al. 2019).

Los mecanismos antibacterianos propuestos de los flavonoides son principalmente los siguientes: inhibición de la síntesis de ácido nucleico, alteración de la función de la membrana citoplasmática, inhibición del metabolismo energético, reducción de la unión celular y formación de biopelículas, inhibición de la porina en la membrana celular, cambio de la permeabilidad de la membrana, atenuación de la patogenicidad daño de la membrana citoplasmática posiblemente al generar peróxido de hidrógeno (Xie et al. 2014).

### Ácido fenólico

Los compuestos fenólicos se han asociado con una serie de propiedades promotoras de la salud. Cowan (1999), Alves y Ferreira (2014) han informado sobre la actividad antimicrobiana de ácidos fenólicos y extractos ricos en fenoles.

Aunque los estudios sobre los compuestos puros y su impacto en la formación de biopelículas son relativamente escasos, se ha informado que algunos ácidos fenólicos, poseen cierta actividad antimicrobiana (Silva et al. 2016).

### Estilbeno: Resveratrol

El resveratrol es un antioxidante polifenólico natural que ha recibido una atención masiva por los posibles beneficios para la salud, incluidas las propiedades anticancerígenas, antienvjecimiento y antimicrobianas. El compuesto es bien tolerado por los humanos y en los últimos años ha sido ampliamente utilizado como nutracéutico. El resveratrol muestra actividad antimicrobiana contra una gama sorprendentemente amplia de especies bacterianas, virales y fúngicas. A concentraciones subinhibitorias, el resveratrol puede alterar la expresión bacteriana de los rasgos de virulencia que conducen a una producción reducida de toxinas, inhibición de la formación de biopelículas, movilidad reducida e interferencia con la detección de quórum (Vestergaard e Ingmer 2019).

## IV. Hipótesis

### Hipótesis de trabajo

El extracto etanólico de propóleo al 7% produce mayores halos de inhibición que el extracto al 10 % y al 30 % ante *Streptococcus mutans*.

### Hipótesis nula

El extracto etanólico de propóleo al 7% no produce mayores halos de inhibición que el extracto al 10% y al 30% ante *Streptococcus mutans*.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## V. Objetivos

### V.1 Objetivo general

Determinar a que concentración el extracto etanólico de propóleo produce mayores halos de inhibición, al 7%, al 10% o al 30% ante *Streptococcus mutans*.

### V.2 Objetivos específicos

- Medir los halos de inhibición del extracto etanólico de propóleo al 7% en cajas Petri inoculadas con *Streptococcus mutans*.
- Medir los halos de inhibición del extracto etanólico de propóleo al 10% en cajas Petri inoculadas con *Streptococcus mutans*.
- Medir los halos de inhibición del extracto etanólico de propóleo al 30% en cajas Petri inoculadas con *Streptococcus mutans*.
- Comparar las mediciones de los halos de inhibición del extracto etanólico de propóleo al, 7%, al 10% y al 30% en cajas Petri inoculadas con de *Streptococcus mutans*.

## VI. Material y métodos

### VI.1 Tipo de investigación

Experimental *In vitro*

### VI.2 Población o unidad de análisis

Cultivos en cajas Petri con agar TYS20B inoculadas con *Streptococcus mutans*.

### VI.3 Muestra y tipo de muestra

El estudio se realizó en 10 cajas Petri con agar TYS20B inoculadas con *Streptococcus mutans*, a las cuales se les colocaron sensidiscos impregandos de extracto etanólico de propóleo a una concentración del 7%, 10% y 30%, así como el control positivo y el control negativo.

#### VI.3.1 Criterios de selección

##### Definición del grupo control

**Control Positivo:** Gluconato de Clorhexidina al 2%

**Control Negativo:** Agua Bidestilada

##### Criterios de inclusión

Cajas petri con agar TYS20B inoculadas con *Streptococcus mutans*.

##### Criterios de exclusión

Cajas petri con agar TYS20B que presenten burbujas o irregularidades en su superficie.

## Criterios de eliminación

Cajas petri con agar TYS20B que sufran contaminación del medio de cultivo, durante el proceso.

### VI.3.2 Variables estudiadas

#### Variable Dependiente

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de variable	Escala de medición	Unidad de medida
*Halo de inhibición	Zona formada alrededor de un disco con medicación que inhibe y detiene el crecimiento bacteriano	Midiendo en mm el halo de inhibición	Cuantitativa	Continua	Milímetros

#### Variable Independiente

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de variable	Escala de medición	Unidad de medida
*Clorhexidina líquida al 2%	Es un antiséptico catiónico de bisguanida utilizado como medicamento intraconducto, con actividad bacteriostática en bajas concentraciones y bactericida en	Será colocada en discos de papel filtro y evaluada en intervalos de tiempo de 24 y 48 horas.	Cuantitativa	Continua	Mililitros

	altas concentraciones.				
<b>Variable</b>	<b>Definición conceptual</b>	<b>Definición operacional</b>	<b>Tipo de variable</b>	<b>Escala de medición</b>	<b>Unidad de medida</b>
*Agua bidestilada estéril	Líquido incoloro, claro y limpio. Estéril y apirógeno.	Será colocada en discos de papel filtro y evaluada en intervalos de tiempo de 24 y 48 horas.	Cuantitativa	Continua	Militros
*Extracto etanólico de propóleo al 7%	Sustancia obtenida por la extracción de una parte del propóleo que es una resina elaborada por las abejas a partir de productos de origen vegetal para proteger sus colmenas, usando como solvente etanol.	Será colocado en discos de papel filtro y evaluado en intervalos de tiempo de 24 y 48 horas.	Cuantitativa	Continua	Militros
*Extracto etanólico de propóleo al 10%	Sustancia obtenida por la extracción de una parte del propóleo que es una resina elaborada por las abejas a partir de productos de origen vegetal para proteger sus colmenas,	Será colocado en discos de papel filtro y evaluado en intervalos de tiempo de 24 y 48 horas.	Cuantitativa	Continua	Mililitros

	usando como solvente etanol.				
Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de variable	Escala de medición	Unidad de medida
*Extracto etanólico de propóleo al 30%	Sustancia obtenida por la extracción de una parte del propóleo que es una resina elaborada por las abejas a partir de productos de origen vegetal para proteger sus colmenas, usando como solvente etanol.	Será colocado en discos de papel filtro y evaluado en intervalos de tiempo de 24 y 48 horas.	Cuantitativa	Continua	Mililitros

#### VI.4 Técnicas e instrumentos

Se incubaron 10 cajas Petri con cultivos de *Streptococcus mutans* en agar TYS20B, a cada una se le colocaron 5 sensidiscos. Tres sensidiscos fueron impregnados con los extractos etanólicos de propóleo a sus diferentes concentraciones 7%, 10% y 30%, el cuarto sensidisco contenía el control positivo clorhexidina al 2% y quinto sensidisco contenía el control negativo agua bidestilada estéril.

A las 24 horas se tomaron fotografías de las cajas Petri para poder documentar el resultado obtenido de la fase experimental, y para realizar la



medición de los halos de inhibición con el programa ImageJ, los resultados de las mediciones fueron recopiladas en una base de datos de Excel.

## **VI.5 Procedimientos**

### **Recolección del propóleo puro**

El propóleo fue recolectado directamente del apiario que colabora con el laboratorio Rosa Elena Dueñas S.a. de C.V. Laboratorio de remedios herbolarios.

La recolección del propóleo se realizó por el apicultor a partir de dos métodos de recolección, para poder obtener la cantidad suficiente de propóleo puro, para la realización de los extractos.

#### Método artesanal o método de raspado:

1. La recolección se efectuó mediante una espátula, desprendiendo el propóleo de la colmena de aquellas zonas donde se encontraba adherido: ángulos, marcos, piezas metálicas, piqueras, tapa, cuadros y caja. Se utilizó una espátula de acero inoxidable sin mucho filo para reducir el riesgo de arrastrar virutas de maderas o pintura. Se desechó el propóleo que se encontraba en el fondo de la colmena, ya que generalmente se encuentra contaminado. (Figura 1a)
2. La recolección se realizó con las manos y espátula libres de restos de miel, tierra o cualquier otra sustancia que pudiera contaminarlo. Durante la cosecha, el propóleo se mantuvo en su forma de escama y/o trozos sueltos, no se expuso a la incidencia directa de los rayos solares, evitando su almacenamiento cerca de fuentes de calor como el ahumador. (Figura 1b)

#### Método técnico:

1. Se colocó sobre los cuadros de la colmena una parrilla de plástico la cuál fue propolizada por las abejas, obtenido fácilmente el propóleo mediante el

raspado. Para facilitar su recolección se introdujo la parrilla en el congelador hasta que quede rígido y así se desprendió más fácilmente.

El propóleo recogido mediante ambos métodos se introdujo en agua hirviendo para retirar las impurezas. Se congeló a  $-10^{\circ}\text{C}$  por 10 minutos para que la resina se tornará más rígida, por último, se colocó a temperatura ambiente en recipientes ámbar hasta su uso, para la preparación de los extractos.



*Figura 1. Recolección propóleo técnica de artesanal*

### **Preparación del extracto de propóleo a sus diferentes concentraciones**

La elaboración del extracto de propóleo estuvo a cargo del laboratorio Rosa Elena Dueñas S.a. de C.V. Laboratorio de remedios herbolarios.

1. Debido a su consistencia y a su heterogeneidad, cada muestra de propóleo en bruto se fracciona mecánicamente en trozos de 2 cm aproximadamente y se colocó en un recipiente de vidrio a  $0^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas, a fin de obtener un producto de consistencia dura y quebradiza.
2. Se maceró hasta formar un polvo fino.
3. En base a la NORMA Oficial Mexicana NOM-003-SAG/GAN-2017, Propóleos, producción y especificaciones para su procesamiento, se pesó una cantidad de 50 gramos del propóleo en bruto, previamente acondicionado, añadiendo etanol al 70% en propóleo: disolvente 1:3 y se dejó macerar con baño ultrasónico por 20 minutos a temperatura ambiente. Pasado este tiempo se filtró en papel de tamaño de poro de  $0,45\ \mu\text{m}$ . El

filtrado se concentró al vacío, se colocó el extracto a un envase ámbar, empleando la mínima cantidad de etanol al 70%, y se dejó a sequedad utilizando una bomba de vacío. Se conservó en refrigeración y se protegió de la luz hasta el momento de realizar las diluciones.

### **Preparación de las diluciones**

Se pesó una cantidad determinada del extracto obtenido y se agregó alcohol etílico para obtener 3 diferentes concentraciones en peso /volumen al 7%, 10% y 30%, se colocó en viales ámbar a temperatura ambiente para su posterior utilización.

### **Preparación de Agar TYS20B**

Preparación de 10 cajas de Agar TYS20B

1. Se pesaron 10 gramos de Agar TRYS20B, 2.5 gramos de extracto de levadura, 50 gramos de sucrosa, en báscula analítica. Se colocaron en un matraz Erlen Meyer de 500 mL. (Figura 2a)
2. Se midieron 250 mililitros de agua destilada y se agregó al matraz donde se encontraba el agar y el resto de los polvos.
3. Se agitó y se dejó reposar 15 minutos.
4. Se calentó hasta obtener su punto de ebullición con agitación constante para disolverlo completamente por un minuto. (Figura 2b)
5. Se esterilizó la solución en autoclave a 121 °C (15lbs de presión) durante 15 minutos.
6. Se dejó enfriar la solución y se añadió en un medio estéril 61 µL de Bacitracina.
7. Se vació el medio en cajas Petri estériles, en un área estéril, hasta que solidificaron. (Figura 1c)

8. Se colocó una de las cajas en incubadora y las demás se almacenaron en refrigerador hasta el uso de éstas.

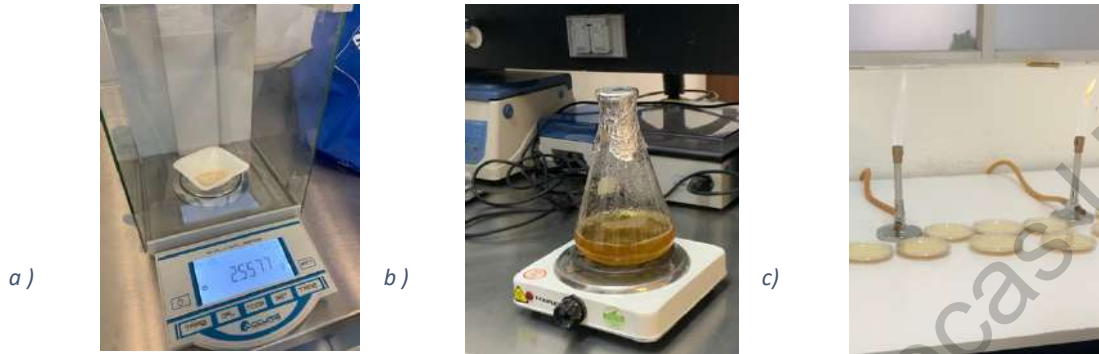


Figura 2. Proceso de preparación del agar TYS20B

### Técnica de siembra de cepas

Reactivación y siembra de cepa.

1. Se colocaron 30  $\mu$ l del tubo de ensayo que contenía la cepa de *Streptococcus mutans* del Laboratorio de Investigación Odontológica Multidisciplinaria de la Facultad de Medicina de la UAQ en un tubo de ensayo con infusión cerebro corazón.
2. Una vez gelificado el agar TYS20B en las cajas Petri, con 2 mecheros de bunsen encendidos, se inició la siembra de las cepas de *Streptococcus mutans*.
3. Se sumergió un hisopo en el tubo de cultivo líquido con *Streptococcus mutans* y se colocó el inóculo en la caja con agar TYS20B, distribuyéndolo uniformemente sobre toda la superficie de la placa para lograr el crecimiento en monocapa. (Figura 3a)
4. En cada caja Petri se colocaron 5 sensidiscos, (previamente estériles y con un diámetro de 6mm) tres contenían un extracto etanólico de propóleo en sus diferentes concentraciones 7%, 10% y 30%, el cuarto contenía el control positivo (clorhexidina al 2%), y el quinto contenía el control negativo (agua bidestilada). (Figura 3b)

5. Las cajas Petri se dejaron en la incubadora a una temperatura de 37°C por 24 horas.

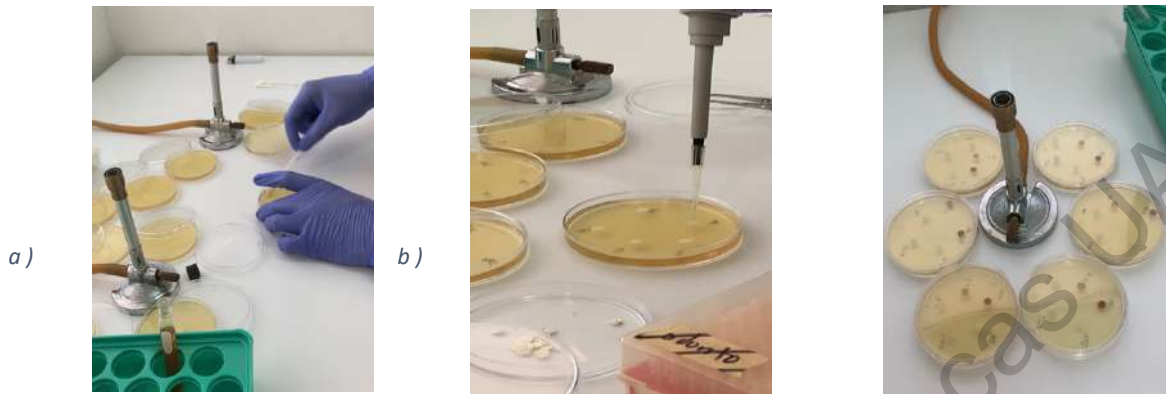


Figura 3. Técnica de siembra y colocación de sensidiscos

### Medición de halos de inhibición

Después de 24 horas de incubación de las cajas Petri con los sensidiscos se tomaron fotografías para registrar los resultados. (Figura 4b) Las fotografías se analizaron por computadora con el programa ImageJ, y se recolectaron los datos obtenidos en una hoja de Excel. (Figura 4b)

Por último las cajas Petri utilizadas se sometieron a un ciclo de esterilización en autoclave a 121 °C por 15 min para su inactivación y posteriormente fueron desechadas.

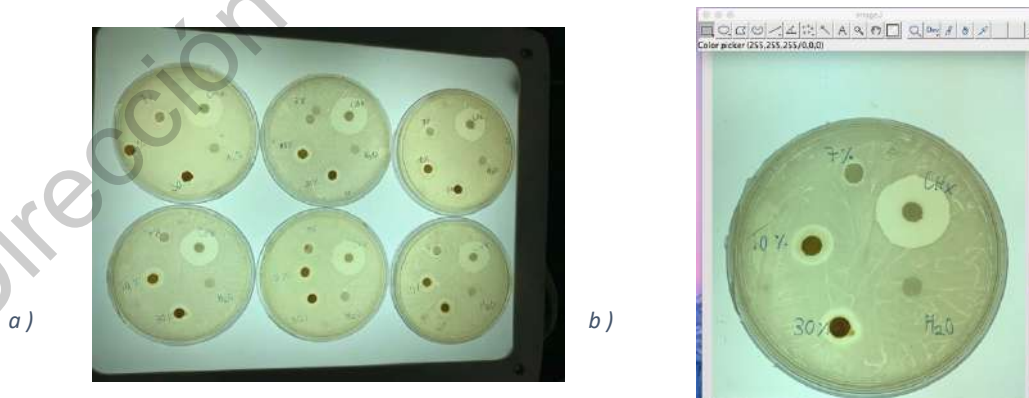


Figura 4. Toma de fotografías posterior a las 24 horas de incubación y evaluación de resultados

### **VI.5.1 Análisis estadístico**

Se analizaron los datos de desviación estándar y rango. Con la prueba Kolmogorov-Smirnov verificamos que las variables seguían una distribución normal, los datos se sometieron a la prueba ANOVA. Posterior a ello se realizó la prueba Post Hoc de Tukey. Se consideró estadísticamente significativo cuando  $p < 0.05$ .

### **VI.5.2 Consideraciones éticas**

El manejo de los desechos se realizó según la NOM-087-ECOL-SSA1. NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-087-ECOL-SSA1-2002, PROTECCIÓN AMBIENTAL - SALUD AMBIENTAL - RESIDUOS PELIGROSOS BIOLÓGICO-INFECIOSOS - CLASIFICACIÓN Y ESPECIFICACIONES DE MANEJO.

El manejo de los desechos biológicos de manera externa fue realizado por la empresa especializada para la recolección de residuos peligrosos, contratada por la Clínica Odontología Benjamín Moreno de la Universidad Autónoma de Querétaro.

## VII. Resultados

En la tabla 1 se muestran las medidas del diámetro en mm del halo de inhibición de los tres extractos de propóleo (extracto de propóleo 7%, extracto de propóleo 10% y extracto de propóleo 30%). Además, se muestran los valores promedio y la desviación estándar correspondiente al tamaño de los halos de inhibición.

Tabla 1. Medidas (en mm) de los halos de inhibición de las extractos de propóleo a diferentes concentraciones ante *S. mutans*.

	<b>Extracto propóleo 7%</b>	<b>Extracto propóleo 10%</b>	<b>Extracto propóleo 30%</b>	<b>Control +</b>	<b>Control-</b>	<b>Valor de P</b>
	X±DE (rango)					
<i>S. mutans</i>	(n=10) 7.6±1.5 (6.2-10.4)	(n=10) 10.7±0.9 (9.5-12.1)	(n=10) 11.3±0.5 (10.8-11.8)	(n=10) 21.7±1.87 (18.2-24.6)	(n= 10) 0 0	< 0.0001 <sup>1*</sup>

<sup>1</sup>Prueba ANOVA \*Estadísticamente significativo

En la Tabla 2 se realizó una comparación entre los halos de inhibición creados por los diferentes extractos de propóleo. Por lo que se puede observar que si hay diferencia estadísticamente significativa entre el extracto de propóleo al 7 % vs el extracto de propóleo al 10% en todos lo halos de inhibición ante *S. mutans*, así como el extracto de propóleo al 7% vs el extracto de propóleo al 30%. Por el contrario no hay diferencia estadísticamente significativa entre el extracto de propóleo al 10% vs el extracto de propóleo al 30% en ningún caso. Es decir, mientras que la tabla 1 muestra cierta diferencia entre los milímetros del halo de inhibición del extracto de propóleo al 10% y el extracto de propóleo al 30%, la tabla 2 nos indica que no es estadísticamente significativo.

Tabla 2. Comparación de los extractos de propóleo a diferentes concentraciones

	Estadísticamente significativo
EP 7% vs. EP 10%	Si
EP 7% vs. EP 30%	Si
EP 7% vs. Control +	Si
EP 7% vs. Control -	Si
EP 10% vs. EP 30%	No
EP 10% vs. Control +	Si
EP 10% vs. Control -	Si
EP 30% vs. Control +	Si
EP 30% vs. Control -	Si
Control + vs. Control -	Si

Se realizó la prueba estadística de comparación múltiple de Tukey Post Hoc para determinar si hay diferencia estadísticamente significativa entre los resultados de los halos de inhibición.

Estos resultados confirman un efecto de inhibición del extracto etanólico de propóleo en sus diferentes concentraciones ante *Streptococcus mutans* (Figura 5).



Figura 5. Efecto inhibitorio medido en mm por medio de halos de inhibición



## VIII. Discusión

Freitas et al. (2006) consideraban al propóleo un buen candidato como adyuvante en el tratamiento o prevención de muchas enfermedades infecciosas, ya muestra una amplia gama de actividad antimicrobiana contra una gran variedad de bacterias, hongos, parásitos y virus, la literatura describe su alta capacidad inhibitoria ya que ha sido estidado con diferentes agentes microbianos.

La actividad biológica del propóleo se asocia frecuentemente con la presencia de compuestos fenólicos, principalmente flavonoides. Dausch et al. (2008) demostraron que el propóleo puede reducir la colonización de microorganismos anaerobios facultativos como *Streptococcus mutans*, actuando en la prevención de la caries dental. Específicamente el presente estudio comprobo esta actividad antibacteriana en *Streptococcus mutans*.

Hendi et al. (2011) realizaron un estudio en el que demostraron que el extracto etanólico de propóleo fue el más eficaz de todos los extractos que estudiaron, mostrando una zona máxima a la concentración del 30%.

Airen et al. (2018) llevaron a cabo un estudio para evaluar la eficacia del extracto de propóleo contra *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus acidophilus*. En ese estudio se probaron dos tipos de extractos, es decir, extractos etanólicos y de agua, a concentraciones de 5% y 20%. Los resultados del estudio indicaron que las concentraciones de extracto etanólico de propóleo fue mas eficaz para inhibir el crecimiento de *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus acidophilus*.

Sin embargo, en el mercado existe gran variedad de concentraciones de extractos etanólicos de propóleo, este estudio pudimos comparar las concentraciones de extracto etanólico de propóleo mas comerciales, con resultados muy favorables, pero se observo que una hubo un resultado estadísticamente significativo cuando se comparo el halo de inhibición producido

por el extracto etanólico de propóleo a la concentración de 10% en comparación al del 30%.

Abbasi et al. (2018) y Przybyłek et al. (2019) realizaron revisiones sistemáticas sobre los últimos estudios científicos en el campo de la actividad antibacteriana del propóleo. Concluyendo que el propóleo es un importante producto antimicrobiano, que actúa tanto contra Gram positivas como Bacterias Gram negativas, aeróbicas y anaeróbicas. Reportando su eficacia para la cicatrización de heridas quirúrgicas, prevención de caries, tratamiento de dentina por hipersensibilidad, tratamiento de úlceras aftosas, como medio de almacenamiento para dientes avulsionados, solución de irrigación del conducto radicular y como enjuague bucal.

Además de una actividad antimicrobiana, también se han demostrado otras propiedades biológicas y farmacológicas para el propóleo, incluidas las propiedades antiinflamatorias, antitumorales, citotóxicas, hepáticas protectoras, antioxidantes, hematoestimuladoras e inmunomoduladoras (Toreti et al. 2013). Son pocos los estudios que describen a detalle su metodología aún para asegurar de manera científica todas estas propiedades lo que deja abierta una basta línea de investigación para proyectos futuros.

## IX. Conclusiones

Se confirma que existe relación entre las investigaciones citadas y los resultados obtenidos en presente estudio. Se demostró que extracto etanólico de propóleo posee cualidades antibacterianas, ya que los extractos a las diferentes concentraciones 7%, 10% y 30% produjeron un halo de inhibición en presencia de *Streptococcus mutans*. Siendo el extracto de etanólico de propóleo al 10% y al 30% los más eficaces. Sin embargo, la presentación para uso comercial del propóleo y sus concentraciones más efectivas siguen siendo líneas abiertas a investigación para hacer más comparativos y determinar las concentraciones más eficaces y tolerables en el consumo humano.

## **IX. Propuestas**

### **Propuestas para la práctica Odontopediátrica**

El uso del propóleo es una alternativa de origen natural, para contribuir a la disminución de uno de los problemas de mayor impacto en la sociedad a nivel de salud pública como es la caries dental. Al ser el propóleo un medio de inhibición del *Streptococcus mutans*, se podrán desarrollar proyectos avalados para realizar productos más económicos como son colutorios, pastas dentales, barnices, chicles, golosinas, entre otros, para el cuidado de la salud bucal. Al hacer uso del propóleo, no sólo se beneficiará el área de salud, sino que además el medio ambiente, la práctica de la apicultura y la preservación de *Apis mellifera* se verán fuertemente beneficiadas.

### **Propuestas para próximas investigaciones**

Se necesitan realizar más estudios para seguir evaluando y poder comprobar mediante el método científico las propiedades antiinflamatorias, antifúngicas y antibacterianas que posee este producto de origen natural, avalando así, la eficacia de productos de uso odontológico que ya se encuentran en el mercado, y que dentro de sus principales componentes se encuentra el propóleo. De igual manera quedan abiertas muchas mas líneas de investigación para evaluar la actividad antibacteriana del propóleo ante diferentes microorganismos patógenos.

## X. Bibliografía

- Bozcuk Erdem, Gamze, and Seval Ölmez. 2004. "Inhibitory Effect of Bursa Propolis on Dental Caries Formation in Rats Inoculated with Streptococcus Sobrinus." *Turkish Journal of Zoology* 28(1): 29–36.
- Bueno-Silva, B. et al. 2013. "Effect of Neovestitol-Vestitol Containing Brazilian Red Propolis on Accumulation of Biofilm in Vitro and Development of Dental Caries in Vivo." *Biofouling* 29(10): 1233–42.
- Cushnie, T. P. Tim, and Andrew J. Lamb. 2011. "Recent Advances in Understanding the Antibacterial Properties of Flavonoids." *International Journal of Antimicrobial Agents* 38(2): 99–107.
- Daugusch, Andreas, Cleber S. Moraes, Patricia Fort, and Yong K. Park. 2008. "Brazilian Red Propolis - Chemical Composition and Botanical Origin." *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 5(4): 435–41.
- Duailibe, Silvana Alves De Carvalho, Azizedite Guedes Gonçalves, and Fernando Jorge Mendes Ahid. 2007. "Effect of a Propolis Extract on Streptococcus Mutans Counts in Vivo." *Journal of Applied Oral Science* 15(5): 420–23.
- Dziedzic, Arkadiusz et al. 2013. "The Antibacterial Effect of Ethanol Extract of Polish Propolis on Mutans Streptococci and Lactobacilli Isolated from Saliva." *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 2013.
- Farhadi, Faegheh, Bahman Khameneh, Mehrdad Iranshahi, and Milad Iranshahy. 2019. "Antibacterial Activity of Flavonoids and Their Structure–Activity Relationship: An Update Review." *Phytotherapy Research* 33(1): 13–40.
- Featherstone, John D.B. 2000. "The Science and Practice of Caries Prevention." *Journal of the American Dental Association* 131(7): 887–99.
- Freitas, S. F., L. Shinohara, J. M. Sforcin, and S. Guimarães. 2006. "In Vitro

Effects of Propolis on Giardia Duodenalis Trophozoites.” *Phytomedicine* 13(3): 170–75.

Hashemi, Jamilah M. 2016. “Biological Effect of Bee Propolis: A Review.” *European Journal of Applied Sciences* 8(5): 311–18.

Hendi, Nada K.K., Habeeb S. Naher, and Alaa H. Al-Charrakh. 2011. “In Vitro Antibacterial and Antifungal Activity of Iraqi Propolis.” *Journal of Medicinal Plant Research* 5(20): 5058–66.

Kishi, M. et al. 2009. “Relationship of Quantitative Salivary Levels of Streptococcus Mutans and S. Sobrinus in Mothers to Caries Status and Colonization of Mutans Streptococci in Plaque in Their 2.5-Year-Old Children.” *Community Dentistry and Oral Epidemiology* 37(3): 241–49.

Kırbıyık, Sema. 2004. “Effects of propolis on dental caries in rats.” *Metallurgical and Materials Transactions A* 30(8): 2221.

Koo, Hyun et al. 2002. “Effects of Compounds Found in Propolis On.” *Society* 46(5): 1302–9.

Libério, Silvana A. et al. 2009. “The Potential Use of Propolis as a Cariostatic Agent and Its Actions on Mutans Group Streptococci.” *Journal of Ethnopharmacology* 125(1): 1–9.

Londoño Orozco, Amparo et al. 2008. “Estudio de La Actividad Antifúngica de Un Extracto de Propóleo de La Abeja Apis Mellifera Proveniente Del Estado de México.” *Tecnología en Marcha* 21(1): 49–55.

Lofly, Mahmoud. 2006. “Biological Activity of Bee Propolis in Health and Disease.” *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 7(1): 22–31.

Maureira, Natalia et al. 2017. “Susceptibilidad de Cepas de Candida Oral a Extracto Etanólico Del Propóleo Chileno de Olmué.” *International journal of odontostomatology* 11(3): 295–303.

- Mohsin, S., B. Manohar, S. Rajesh, and Y. Asif. 2015. "The Effects of a Dentifrice Containing Propolis on Mutans Streptococci: A Clinico-Microbiological Study." *Ethiopian journal of health sciences* 25(1): 9–16.
- Noriega, Vanesa, Salmón Director, : Elías, and Rodríguez Martín. 2014. "Propolis, Another Therapeutic Resource in the Clinical Training."
- Núñez, Daniel Pedro, and Lourdes García Bacallao. 2010. "Bioquímica de La Caries Dental." *Revista Habanera de Ciencias Medicas* 9(2): 156–66.
- Papachristoforou, Alexandros et al. 2019. "Photometric Analysis of Propolis from the Island of Samothraki, Greece. The Discovery of Red Propolis." *Chemistry and Biodiversity*.
- Riverón, Johany Duque De Estrada, José Alberto Pérez Quiñonez, and Iliana Hidalgo Gato Fuentes. 2006. "Caries Dental y Ecología Bucal, Aspectos Importantes a Considerar." *Revista Cubana de Estomatología* 43(1).
- Senpuku, Hidenobu et al. 2019. "Effects of Complex DNA and MVs with GTF Extracted from Streptococcus Mutans on the Oral Biofilm." *Molecules* 24(17): 3131.
- Shabbir, Ambreen, Maryam Rashid, and Hamid N Tipu. 2016. "Propolis, A Hope for the Future in Treating Resistant Periodontal Pathogens." *Cureus*.
- Silva, Sara et al. 2016. "Anti-Biofilm Potential of Phenolic Acids: The Influence of Environmental PH and Intrinsic Physico-Chemical Properties." *Biofouling* 32(8): 853–60.
- Simón-Soro, Aurea, and Alex Mira. 2015. "Solving the Etiology of Dental Caries." *Trends in Microbiology* 23(2): 76–82.
- Singh, Deepti et al. 2019. "Antibacterial Activity of Resveratrol Structural Analogues: A Mechanistic Evaluation of the Structure-Activity Relationship."
- Toreti, Viviane Cristina, Helia Harumi Sato, Glaucia Maria Pastore, and Yong Kun

Park. 2013. "Recent Progress of Propolis for Its Biological and Chemical Compositions and Its Botanical Origin." *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 2013.

Vestergaard, Martin, and Hanne Ingmer. 2019. "Antibacterial and Antifungal Properties of Resveratrol." *International Journal of Antimicrobial Agents* 53(6).

Viuda-Martos, M., Y. Ruiz-Navajas, J. Fernández-López, and J. A. Pérez-Álvarez. 2008. "Functional Properties of Honey, Propolis, and Royal Jelly." *Journal of Food Science* 73(9): 117–24.

Xie, Yixi et al. 2014. "Antibacterial Activities of Flavonoids: Structure-Activity Relationship and Mechanism." *Current Medicinal Chemistry* 22(1): 132–49.

Dirección General de Bibliotecas UHO



## XI. Anexos

### X1.1 Hoja de recolección de datos

<b>Streptococcus mutans</b>					
<b>CAJA</b>	<b>EP 7%</b>	<b>EP 10%</b>	<b>EP 30%</b>	<b>Control +</b>	<b>Control -</b>
<b>Promedio</b>					
<b>Desviación estandar</b>					
<b>Rango</b>					

Dirección General de Bibliotecas UAQ

## XI.2 Instrumentos

1. Cajas Petri (Senna®, 60 x 15, producto previamente estéril)
2. Agar TYS20B
3. Levadura
4. Sucrosa
5. Bacitracina
6. Clorhexidina al 2%
7. Extracto de propóleo 7%
8. Extracto de propóleo 10%
9. Extracto de propóleo 30%
10. Agua bidestilada estéril
11. Matraz Erlenmeyer
12. Hisopos estériles
13. Agua bidestilada
14. Espátula
15. Loseta de vidrio
16. Guantes
17. Cubrebocas
18. Lentes de protección
19. Micropipeta
20. Puntas de micropipeta
21. Plumón indeleble
22. Pluma
23. Báscula analítica
24. Incubadora
25. Auto clave
26. Cepas inoculadas de *Streptococcus mutans*
27. Asa bacteriológica
28. Mechero bunsen
29. Cuchara dosificadora
30. Campos estériles
31. Bata de algodón
32. Papel
33. Parrilla eléctrica
34. Papel filtro estéril
35. Regla
36. Pinzas curación estéril
37. Tijeras
38. Papel parafilm "M"
39. Cámara de anaerobios
40. Sanitas