

ARTÍCULO ORIGINAL

Online ISSN: 2665-0193

Print ISSN: 1315-2823

Efecto antimicrobiano de membranas de quitosano y propóleo sobre bacterias de interés odontológico**Antimicrobial effect of chitosan and propolis membranes on bacteria of dental interest**

Cedillo Medina Isbel Alejandra ¹, Fernández Becerra Yaneth del Valle ¹,
González Anajulia ², Salas-Osorio Elaysa ³

¹Odontólogo. Universidad de los Andes. Mérida, Venezuela. ²Centro de Investigaciones Odontológicas. Facultad de Odontología. Universidad de los Andes. Mérida, Venezuela.

³Profesor Asociado. Cátedra de Microbiología. Departamento de Biopatología. Facultad de Odontología. Universidad de los Andes. Mérida, Venezuela.

elaysalas72@gmail.com

Recibido 17/02/2022

Aceptado 25/04/2022

Resumen

El área de la salud se mantiene en una continua exploración de nuevas opciones para el control de infección siendo los productos naturales una gran alternativa. Actualmente el quitosano y propóleo son ampliamente utilizados en Odontología, con resultados favorables. De allí que se planteó determinar mediante una investigación explicativa con diseño experimental de laboratorio, el efecto antibacteriano de una membrana de quitosano y propóleo sobre patógenos de interés odontológico. Se determinó la actividad antibacteriana preliminar de tintura propóleo al 45% (TP45%) sobre *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* y *Pseudomonas aeruginosa* utilizando la técnica de difusión en agar modificada con pozos, posteriormente se determinó la concentración inhibitoria mínima (CIM) mediante macrodilución en tubos y se elaboraron las membranas de quitosano/propóleo, las cuales se evaluaron a través del método de difusión en agar por triplicado, utilizando como control gluconato de clorhexidina al 0,12%. *S. aureus* fue más susceptible que *E. faecalis*, no se observó efecto inhibitorio sobre *P. aeruginosa*. La CIM para *S. aureus* fue 16 ug/mL mientras que para *E. faecalis* fue 128 ug/mL. TP45% mostró actividad frente las bacterias Gram positivas, sin embargo, el efecto no se conservó en las membranas de quitosano/propóleo.

Palabras clave: quitosano, propóleo, compuestos antibacterianos, membranas.

Summary

The health area is constantly exploring new options for infection control, with natural products being a great alternative. Chitosan and propolis are currently widely used in dentistry, with favorable results. Hence, it was proposed to determine, through an explanatory investigation with an experimental laboratory design, the antibacterial effect of a chitosan and propolis membrane on pathogens of dental interest. The preliminary antibacterial activity of 45% propolis dye (TP45%) on *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* and *Pseudomonas aeruginosa* was determined using the modified agar diffusion technique with wells, subsequently the minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by macrodilution in tubes. and the chitosan/propolis membranes were prepared, which were evaluated by the agar diffusion method in triplicate, using 0.12% chlorhexidine gluconate as a control. *S. aureus* was more susceptible than *E. faecalis*, no inhibitory effect on *P. aeruginosa* was observed. The MIC for *S. aureus* was 16 ug/mL while for *E. faecalis* it was 128 ug/mL. TP45% showed activity against Gram positive bacteria, however, the effect was not preserved in chitosan/propolis membranes.

Keywords: chitosan, propolis, antibacterial compounds, membranes.

Introducción

La cavidad bucal es considerada un ecosistema microbiano¹, ya que alberga innumerables bacterias que conforman la microbiota bucal; donde algunas de ellas tienen capacidad odontopatógena², tal es el caso de *Streptococcus* del grupo *mutans*³, *Lactobacillus*⁴, *Actinomyces*⁴, *Porphyromonas gingivalis*⁴, *Prevotella intermedia*⁵, *Tannerella forsythia*³, *Treponema denticola*⁵, *Fusobacterium nucleatum*⁴ y *Staphylococcus aureus*⁶, quienes pueden ser

causantes de diferentes enfermedades bucales⁷. Además de la microbiota bucal antes mencionada, otras bacterias exógenas, pueden causar sobreinfecciones, donde se aíslan enterobacterias como *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*; bacterias que cuentan con una diversidad de factores de virulencia y resistencia antimicrobiana y afectan otros sitios anatómicos.⁸

Por décadas, la clorhexidina se utiliza como el antiséptico bucal de elección para la prevención, manejo y control de infecciones bucales⁹; No obstante, ha demostrado efectos adversos al emplearla por tiempo prolongado y algunos efectos tóxicos, como la tinción en dientes, tejidos blandos y restauraciones, alteración del sabor, sensación de ardor e irritación de la mucosa y tumefacción parotídea.¹⁰⁻¹¹

En el área de la salud se han estudiado los productos naturales, como respuesta al incremento de la resistencia a los antibióticos y sus efectos secundarios¹², así como por sus múltiples propiedades terapéuticas, fácil disponibilidad y costos accesibles¹³. De allí destaca el uso de tratamientos apícolas llamados “apiterapia”, siendo el propóleo uno de los más conocidos¹³. El propóleo es un polímero resinoso natural producido por las abejas¹² a partir de las plantas^{10,13} y exudados de las cortezas de los árboles¹³, ésta resina lipofílica es pegajosa y flexible al exponerse al calor, o dura y quebrantable a bajas temperaturas¹². En sus propiedades, el propóleo destaca como agente antioxidante^{14,15}, antitumoral^{14,15}, antimicrobiano¹⁴, antiinflamatorio^{12,14}, antifúngico^{12,14,15}, anticancerígeno y antiviral^{2,18,21,22,24,26} así como se ha encontrado actividad antibacteriana^{12,14} sobre diversos microorganismos, reconocidos como resistentes a los antibióticos¹⁵. 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 películas¹⁶. En odontología se ha incorporado en múltiples usos con resultados beneficiosos donde se destacan el efecto antibiopelícula^{12,14}, desinfectante¹² y sellador endodóntico¹³, desinfectante cavitario, agente preventivo de la hipersensibilidad dentaria^{12,13}, material restaurativo, efecto cariostático¹², antiinflamatorio, coadyuvante en el tratamiento de la enfermedad periodontal¹²⁻¹⁴, preservante de la vitalidad de células periodontales en dientes avulsionados¹⁴, inductor de la regeneración tisular periodontal²¹ y reparación de la mucosa bucal ulcerada.¹²⁻¹⁴

En otro orden de ideas, el quitosano, es derivado de la desacetilación de la quitina, el segundo polisacárido más abundante del planeta y cuya fuente de obtención principal son los exoesqueletos de los crustáceos^{13,17} como el cangrejo y camarón¹⁸, algunos insectos, hongos y plantas^{17,18}. El quitosano es considerado un polisacárido con una inmensa cantidad de beneficios, donde resalta el ser biocompatible, biodegradable, bioadhesivo, no tóxico y además de bajo costo¹⁷⁻¹⁹, con múltiples propiedades donde se destaca como agente antibacteriano.¹⁸

Debido a esto, se convierte en un agente ideal para aplicaciones tópicas y sistémicas en la medicina y farmacología, para el tratamiento de infecciones²⁰. La actividad antimicrobiana del quitosano presenta un amplio espectro que incluye bacterias Gram negativas, Gram positivas y hongos¹⁹; su cualidad más noble radica en la estructura molecular, ya que posee grupos funcionales reactivos que permiten realizar diferentes uniones electroquímicas a nivel celular y molecular; convirtiéndolo en un vehículo ideal para fármacos.¹⁹

En el ámbito odontológico el quitosano, ha demostrado su actividad antimicrobiana al cubrir superficies y protegerlas contra infecciones; específicamente se ha comprobado que las superficies recubiertas con quitosano resisten la biopelícula de *S. epidermidis*, *S. aureus*,

Klebsiella pneumoniae, *P. aeruginosa* y *Candida albicans*.^{8,16}

Además, se ha empleado en diferentes formas como membranas, hidrogeles, gelatinas, entre otras^{17,19} y en distintas disciplinas, tales como, endodoncia para el tratamiento e irrigación del canal radicular^{13,19}, periodoncia^{13,17} y cirugía en la restitución de tejidos duros y blandos perdidos¹³, regeneración ósea guiada¹⁷ y para cubrir defectos óseos causados por diversas etiologías.^{13,17,19}

Investigadores han planteado el uso de quitosano como vehículo de otras sustancias^{20,21}. En el caso del propóleo, demostraron la posibilidad de unión a través de interacciones químicas¹⁰. Lo que vislumbró la oportunidad de estudiar la acción antimicrobiana de dichos compuestos en conjunto, bajo diferentes presentaciones y su posible aplicación en las especialidades de la odontología, tales como: operatoria dental desarrollando un barniz y gel adhesivo de quitosano/propóleo con posible efecto anticariógeno^{14,21}, en endodoncia utilizando un gel de quitosano/propóleo como posible irrigante y medicamento intraconducto.²²

Se ha estudiado el papel del propóleo en nanopartículas con quitosano contra *E. faecalis*; demostrando 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 quirúrgico²⁰. A pesar de contar con suficientes estudios *in vivo* que han evaluado la actividad antimicrobiana, de membranas de quitosano combinadas con propóleo sobre bacterias odontopatógenas son escasos los estudios, *in vitro*, es por ello, que el objetivo de esta investigación fue el establecer la concentración de propóleo presente en una membrana de quitosano que garantice un efecto antibacteriano sobre *S. aureus*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa*.

Materiales y Métodos

Como monitores biológicos fueron utilizadas las cepas bacterianas *S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 29212, *P. aeruginosa* ATCC 27853, pertenecientes al cepario de la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Odontología de la Universidad de Los Andes. La Tintura de Propóleo al 45% P/V (TP45%) fue adquirida en la Tienda Apícola ubicada en el sector El Espejo de la ciudad de Mérida - Venezuela.

Por su parte el gel de quitosano al 5% fue cedido por el Centro de Investigaciones Odontológicas de la Facultad de Odontología de la Universidad de Los Andes (ULA)²³. Los monitores biológicos se reactivaron, inoculando 20 µL de cada cepa en tubos de caldo tripticasa soya (HiMedia) y se incubaron a 35°C ± 2°; se realizó un subcultivo a agar tripticasa soya (HiMedia),

se incubó a 35°C ± 2° y se verificó la pureza de las cepas. A partir de los cultivos sólidos, se prepararon suspensiones bacterianas, en tubos de 5 mL de solución fisiológica salina estéril, hasta lograr una turbidez 0.5 de la escala McFarland.

Fase I: Prueba preliminar de susceptibilidad a la tintura de propóleo al 45% y el gel de quitosano

Se inocularon, por triplicado, 180 µL (2%) de la suspensión bacteriana 0,5 McFarland obtenida en el paso anterior, en tubos de 12 mL de agar Müller-Hinton fundido y temperado a 45°C, se homogenizó y se vertió sobre placas de Petri que contenían cilindros de acero y se dejó solidificar para proceder retirar los cilindros. Se dispensaron 10 µL de los agentes antimicrobianos en estudio (Figura 1).

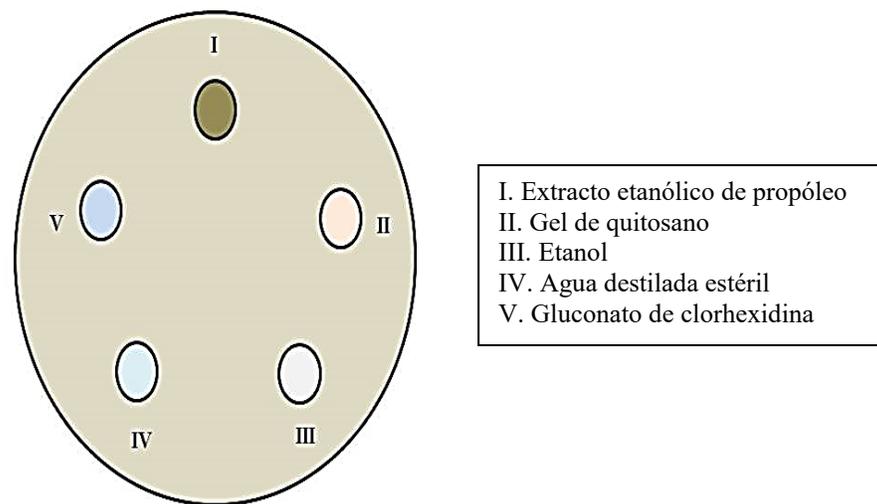


Figura 1. Distribución de los agentes antimicrobianos en evaluación y los controles en la placa de agar Müller-Hinton con pozos.

Así como los compuestos utilizados para la preparación de la tintura de propóleo y el gel de quitosano en el pozo correspondiente (Figura 2); se dejaron reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las placas obtenidas 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 evidenció el efecto antibacterial, mediante la presencia de halos de inhibición y se realizaron las medidas por reverso de las placas con ayuda de un vernier (Figura 3). En el caso

del ácido acético el experimento se realizó en placas separadas por ser éste un compuesto volátil podía comprometer los resultados. Los

valores obtenidos se compararon con la escala de Durafford²⁴.



Figura 2. Incorporación de TP45% al pozo

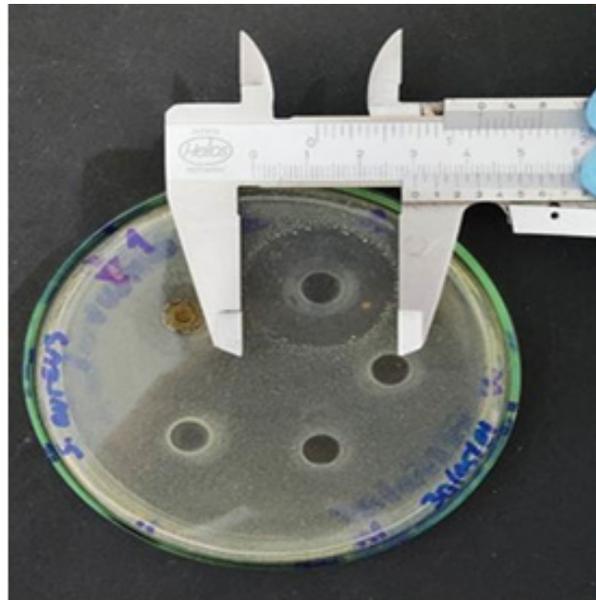


Figura 3. Medida de halos de inhibición con el vernier

Fase II: Determinación la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) del extracto etanólico de propóleo

Se empleó el método de macrodilución en caldo²⁵. A partir de una solución madre de tintura de propóleo (1280µg/mL) y tomando en cuenta los resultados obtenidos en la prueba preliminar, se prepararon diluciones en el rango de diluciones de 1; 2; 4; 8; 16; 32; 64 y 128 µg/mL.

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 y se realizó una dilución 1:10 (9 mL de SSFE + 1 mL del inóculo 0,5 McFarland).

Adicionalmente se prepararon tubos con Gluconato de Clorhexidina como control

positivo y agua destilada como control negativo. Todos los tubos fueron inoculados, por triplicado, con 1 mL de la dilución 1:10 del inóculo bacteriano, seguidamente se homogenizaron y se incubaron a 37°C durante 24 horas. La CIM correspondió a la menor concentración donde no se observó turbidez en cualquiera de los tubos.

Fase III: Prueba de susceptibilidad microbiana de la membrana de quitosano – propóleo experimental

Se prepararon membranas, colocando en placas plásticas 1 mL del gel ácido de quitosano al 5% y un volumen de tintura de propóleo necesario para alcanzar las concentraciones establecidas (Tabla 1) y se mezcló hasta homogeneizar.

Las placas plásticas fueron llevadas a una estufa de calor seco a 55°C durante 16 horas hasta obtener las membranas de quitosano – propóleo

(MQP), las cuales fueron removidas manualmente, recortadas en tamaños de 2 mm x

2 mm y sometidas a esterilización con luz ultravioleta.

Tabla 1. Susceptibilidad de *S. aureus*, *E. faecalis* y *P. aeruginosa* a la tintura de propóleo al 45%

Cepa	Tiempo de Incubación	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 límite	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 límite
	48 h	-	10,5 ± 1,2 (10,8) Sensibilidad límite

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

Resultados

Fase I: Prueba de susceptibilidad bacteriana

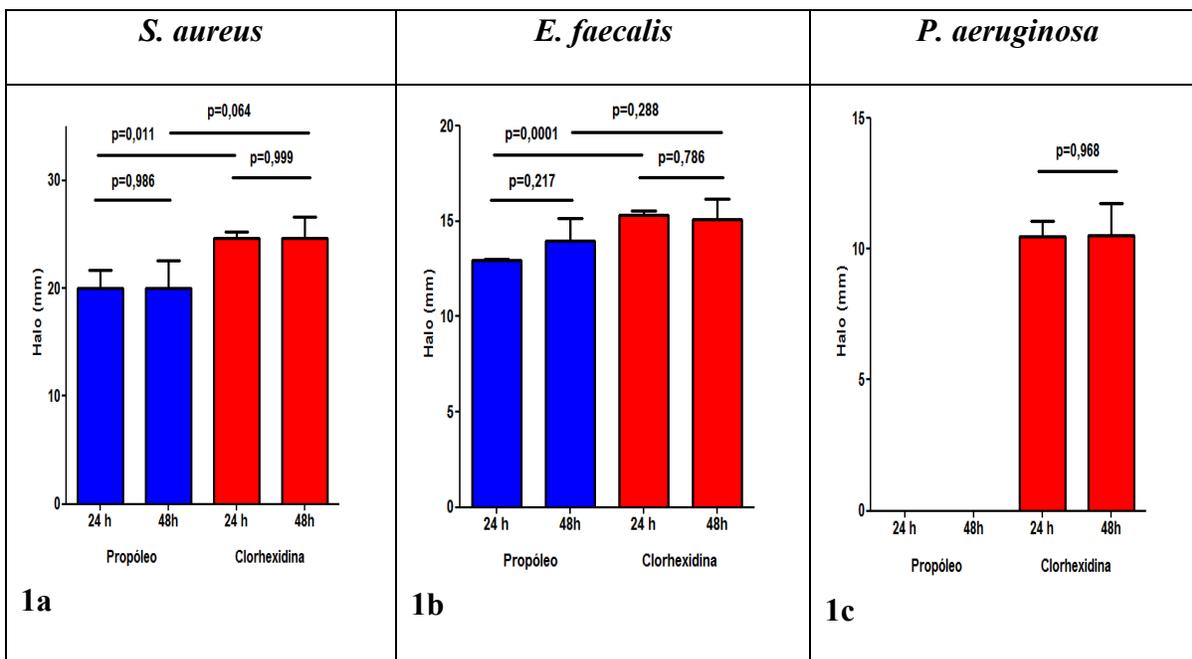
La Tabla 1, exhibe los resultados de actividad antibacteriana preliminar de la tintura de propóleo al 45% (TP45%) sobre las cepas en estudio, ya que no se observó efecto inhibitor en el resto de los agentes antimicrobianos evaluados.

Por otra parte, en la figura 4, al comparar los resultados obtenidos con la escala de Duraffourd, se evidencia que *S. aureus* (1a) fue la cepa bacteriana más susceptible con halos de inhibición de 20 ± 1,7 mm (19) para TP45% y 24,7 ± 0,6 mm (25) para clorhexidina a las 24 horas; 20 ± 2,5 mm (19,9) para TP45% y 24,7 ± 1,9 mm (25,3) para clorhexidina a las 48 horas mostrando una diferencia estadísticamente

significativa. Para *E. faecalis* (1b), la comparación de las medidas de los halos obtenidos en la tintura de propóleo y clorhexidina establecen que no existe diferencia significativa entre los valores; para la Tintura de Propóleo las medidas se hallaron dentro de la susceptibilidad límite 13 ± 0,1 mm (13) a las 24 horas y 14 ± 1,2 mm (13,5) a las 48 horas, mientras que para el control positivo se mantuvieron en el rango de susceptibilidad media 15,3 ± 0,3 mm (15,2) a las 24 horas y 15,1 ± 1,1 mm (15,6) a las 48 horas; sin embargo, entre los valores de los halos inhibitorios tomados a las 24 horas se establece una diferencia significativa donde $p=0,0001$; ya que la tintura de propóleo demostró una susceptibilidad límite y el control positivo susceptibilidad media. Cabe destacar que los halos de inhibición exhibidos por *S. aureus* y *E. faecalis* (luego de 48 horas) fueron comparables

con los del control positivo (gluconato de clorhexidina), cuyos halos mostraron una

susceptibilidad límite a las 24 horas que varió a susceptibilidad media luego de 48 horas.



Las barras muestran la media ± 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 $p < 0,05$.

Figura 4. Susceptibilidad de *S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 29212 y *P. aeruginosa* ATCC 27853 a la tintura de propóleo al 45%

En el caso de *P. aeruginosa* (1c) no se observó efecto antibacteriano frente a la tintura de Propóleo, mientras que exhibió una susceptibilidad límite en el control positivo. $10,5 \pm 0,6$ mm (10,4) a las 24 horas y $10,5 \pm 1,2$ mm (10,8) a las 48 horas. No se observó efecto inhibidor en las cepas, por parte del gel de

quitosano, ni el etanol al 99%, utilizados como excipientes en este estudio. Es importante aclarar que, con respecto a la escala de Duraffourd, los resultados plasmados en la tabla 2 se ciñen a la bibliografía consultada que indica el uso del término sensibilidad, sin embargo, el término adecuado es susceptibilidad²⁵.

Tabla 2. Preparación de las membranas de quitosano/propóleo.

Cepa	Gel de quitosano 5%	Tintura de propóleo 45%	Concentración de la membrana Q/P
<i>E. faecalis</i>	1 mL	284 µL	128 µg/mL
ATCC 29212	1 mL	568 µL	256 µg/mL
<i>S. aureus</i>	1 mL	35,5 µL	16 µg/mL
ATCC 25923	1 mL	71,1 µL	32 µg/mL

Fase II: Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) del extracto etanólico de propóleo

La Figura 5, muestra una CIM para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 de 8 µg/mL ratificando su mayor susceptibilidad a la tintura de propóleo respecto a la CIM de 128

µg/mL obtenida para *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

Es importante resaltar que el gluconato de clorhexidina mostró una gran actividad inhibitoria a bajas concentraciones sobre las bacterias estudiadas.

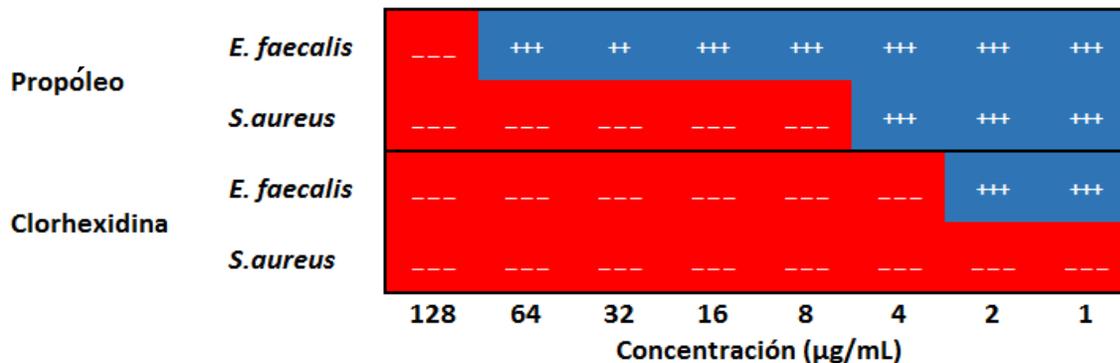


Figura 5. Concentración Inhibitoria mínima de la Tintura de propóleo al 45% para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

Fase III: Susceptibilidad bacteriana frente a la 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 TP45% ensayadas.

Discusión

Es ampliamente reconocido que el uso indiscriminado de los antibióticos produce un incremento en la resistencia bacteriana a los mismos²⁶. 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 antibióticos²⁶ y dificultan el uso de tratamientos convencionales²⁷, se encuentra *Staphylococcus aureus* resistente a la metilina (SARM)²⁶, *Enterococcus faecalis* responsable de los fracasos e infecciones en endodoncia²⁶ y *Pseudomonas aeruginosa* considerada factor agravante de la enfermedad periodontal.²⁷

Mayta *et al* (2010)²⁸ determinaron que el extracto etanólico de propóleo presenta un mayor efecto inhibitorio sobre cepas de *S. aureus*, resultados que coinciden con la presente investigación. Por otra parte, Barragán (2015)²⁹ al estudiar el efecto antibacteriano *in vitro* de una tintura de propóleo sobre *E. faecalis*, observó una media de halos de 10,18 mm similar a lo hallado por Infantes (2017)³⁰, cuya investigación demostró una media de halos de inhibición de 13,72 mm, siendo éste el valor cercano a los aquí presentados. En el caso de *P.*

aeruginosa, investigaciones revelan la presencia de inhibición por el antimicrobiano en estudio^{8,31,32}, a diferencia de la susceptibilidad nula encontrada en este trabajo. Esto nos permite inferir que la tintura de propóleo contiene compuestos bioactivos capaces de afectar de una manera eficaz a las estructuras y el metabolismo de las bacterias Gram positivas respecto a las Gram negativas^{10,15}. De allí que es importante ensayar dicho compuesto sobre otras bacterias Gram negativas asociadas a procesos infecciosos odontológicos, tomando como punto de partida las diferencias estructurales, metabólicas, biológicas, de virulencia, existentes entre ellas y sin dejar a un lado el hecho de que es ampliamente reconocido que la composición del propóleo puede variar dependiendo de diversos factores tales como origen, clima, tipo de abeja^{12,14} 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 y continuar la búsqueda de la molécula bioactiva responsable del efecto inhibitorio.

Con respecto a los resultados obtenidos con los otros agentes antimicrobianos evaluados en este estudio; en la primera fase, se observó que al igual que Tapia (2018)³³, que el gluconato de clorhexidina al 0,12% posee mayor actividad antibacteriana que el extracto etanólico de propóleo. Es importante señalar que para obtener la tintura o extracto etanólico de propóleo, se requiere etanol al 99% como diluyente; conociendo sus propiedades antimicrobianas, se evaluó su inocuidad sobre las bacterias objeto de prueba, verificando la ausencia de tal efecto, por lo cual, la actividad antibacteriana obtenida fue netamente atribuida al propóleo.

Por otra parte Luaces²² estudió la actividad del gel de quitosano sobre *E. faecalis*, hallando una media en el halo inhibitorio de 17,71 mm, resultados que difieren de los obtenidos, puesto

que el gel de quitosano utilizado no mostró actividad sobre ninguna de las cepas estudiadas.

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 CLSI.²⁵

En la fase II de este trabajo, se obtuvo 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. (2019)³⁴ 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, Akca et al (2016)¹⁰ estudiaron el efecto antimicrobiano del extracto etanólico de propóleo proveniente de Turquía, sobre diferentes grupos de microorganismos incluyendo patógenos bucales, determinaron que la CIM para *S. aureus* fue 128 µg/mL y para *E. faecalis* de 64 µg/mL, de allí se infiere que el propóleo sea cual sea su origen posee la capacidad de inhibir bacterias patógenas en sus diferentes concentraciones.

Con respecto a la Clorhexidina utilizada como control positivo, se observó crecimiento en concentraciones inferiores a 4 µg/mL para *E. faecalis* mientras que *S. aureus* no se halló en ninguna de las diluciones realizadas (CIM <1 µg/mL), resultados que difieren de los encontrados por Akca et al. (2016)¹⁰, quienes determinaron una CIM de 64 µg/mL para *S. aureus* y de 16 µg/mL para *E. faecalis*.

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 biomoléculas³⁵, 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 contrarios a los obtenidos Luaces (2017)²², quien 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.

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.

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 medicina.³⁵

Una de sus más importantes aplicaciones es la capacidad de brindar alivio a pacientes a partir de la descarga prolongada de fármacos durante cierto tiempo.³⁵

Conclusiones

La tintura de propóleo al 45% mostró un efecto inhibitor mayor sobre las bacterias Gram positivas propuestas en esta investigación, siendo *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 la bacteria más susceptible con una CIM de 8 µg/mL. El gel de quitosano resultó ser inocuo para las tres bacterias estudiadas; y tampoco se evidenció la presencia de actividad antibacteriana de las membranas de Q/P en las concentraciones ensayadas sobre las bacterias objeto de estudio.

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.

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. Available from: <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. Available from: <https://repositorioacademico.upc.edu.pe/handle/10757/528160>
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. Available from:

- <http://revistas.ces.edu.co/index.php/odontologia/article/view/3681>
4. Pimentel-Ramirez E, Castillo-Andamayo D, Quintana-Del Solar M, Maurtua-Torres D, Villegas-Vílchez L, Díaz-Santisteban C. Efecto antibacteriano de extractos etanólicos de plantas utilizadas en las tradiciones culinarias andinas sobre microorganismos de la cavidad bucal. *Rev Estomatol Hered* [Internet]. 2015;25(3):268. Available from: <https://revistas.upch.edu.pe/index.php/REH/article/view/2736>
 5. Hurtado-Camarena A, Bojórquez-Anaya Y, Montaña-Pérez M, López-Mendoza J. Bacterias asociadas a enfermedades periodontales. *Oral* [Internet]. 2016;17(54):1374–8. Available from: <https://www.medigraphic.com/pdfs/oral/ora-2016/ora1654f.pdf>
 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. Available from: <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. Available from: <http://scielo.sld.cu/pdf/est/v54n1/est08117.pdf>
 8. Leo M., Martínez L., Rincón F y Ortiz, R. Propiedades químicas y microbiológicas de membranas de quitosano/propóleo con utilidad para regeneración tisular en cavidad bucal. *Acta bioclinica*. Volumen 11, N° 22, Julio/diciembre 2021. DOI: <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.142005539>.
 9. 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. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31029127>.
 10. Akca A, Akca G, Topçu F, Macit E, Pikdöken 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. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2016/3627463/>.
 11. 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. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30324925>.
 12. 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. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5768961/>
 13. 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. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30517428>
 14. 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. Available from:

- <https://www.actaodontologica.com/ediciones/2010/2/art-23/>
15. 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. Available from: <http://revistas.unitru.edu.pe/index.php/agroindscience/article/view/1281>
 16. 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. Available from: <https://bmccomplementmedtherapies.biomedcentral.com/articles/10.1186/1472-6882-14-478>
 17. 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 Odontoestomatol* [Internet]. 2015;225:1–14. Available from: https://www.researchgate.net/publication/282780061_Estudio_comparativo_histologico_d_e_la_eficiencia_del_xerogel_y_liposoma_a_base_de_Quitosano_para_el_tratamiento_de_la_osteitis_alveolar_en_ratas_Wistar
 18. 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. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5553419/>.
 19. 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. Available from:
 20. 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. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28362873>
 21. 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. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4192612/>
 22. Luaces G. “Acitividad antimicrobiana in vitro del chitosan/propóleo en gel sobre *Enterococcus faecalis*”. [Tesis] [Internet]. Ecuador: Universidad de Cuenca; 2017. Available from: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/28167>
 23. 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). Available from: <https://www.actaodontologica.com/ediciones/2014/2/art-2/#>
 24. 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. Available from: <https://dspace.unitru.edu.pe/handle/UNITRU/209>
 25. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. CLSI supplement M100. Clinical and Laboratory Standards Institute [Internet]. 31st ed. 2021. Available from:

- <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m100/>
26. 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. Available from: <https://repository.javeriana.edu.co/handle/10554/8889>
 27. Ferreira S, Cardoso A. Presença de Enterobacteriaceae e Pseudomonadaceae na cavidade bucal humana. Rev Odontol UNESP [Internet]. 1998;27(2):473–84. Available from: <https://revodontolunesp.com.br/article/5880178a7f8c9d0a098b47a6/pdf/rou-27-2-473.pdf>
 28. 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). Rev Estomatológica Hered [Internet]. 2016;19(2):19–24. Available from: <https://revistas.upch.edu.pe/index.php/REH/article/view/1777>
 29. 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. Available from: <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/5797>
 30. 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. Available from: <http://repositorio.uladech.edu.pe/handle/123456789/4659>
 31. 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). Available from: <https://www.mdpi.com/2076-2607/8/2/243>
 32. 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 sénil. Rev Salus UC [Internet]. 2016;20(1):27–33. Available from: <http://ve.scielo.org/pdf/s/v20n1/art06.pdf>
 33. 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. Available from: https://alicia.concytec.gob.pe/vufind/Record/UDHR_4b0f47be740843fb9423f896c3fcf4d4/Details
 34. 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. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6778618/>
 35. Hossain A, Roy S, Guin PS. The Importance of Advance Biomaterials in Modern Technology : A Review. Asian J Res Chem. 2017;4(10).