



Revista Estomatológica Herediana
ISSN: 1019-4355
ISSN: 2225-7616
faest.revista@oficinas-upch.pe
Universidad Peruana Cayetano Heredia
Perú

Efecto inhibidor in vitro del extracto etanólico de propóleo al 15% y 30% frente a cepas de *Lactobacillus acidophilus*

Huaytalla Alemán, Richard M; Gálvez Ramírez, Carlos M; Carhuapoma-Yance, Mario; Alvarez-Paucar, María A; López Guerra, Sofía

Efecto inhibidor in vitro del extracto etanólico de propóleo al 15% y 30% frente a cepas de *Lactobacillus acidophilus*

Revista Estomatológica Herediana, vol. 28, núm. 1, 2018

Universidad Peruana Cayetano Heredia, Perú

Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=421558065005>

DOI: <https://doi.org/10.20453/reh.v28i1.3281>

Efecto inhibidor in vitro del extracto etanólico de propóleo al 15% y 30% frente a cepas de *Lactobacillus acidophilus*

In vitro Inhibitory effect of ethanolic propolis extract at 15% and 30% against strains of *Lactobacillus acidophilus*

Richard M Huaytalla Alemán rmha2525@gmail.com

Universidad Privada Norbert Wiener, Perú

Carlos M Gálvez Ramírez

EAP Odontología, Universidad Privada Norbert Wiener., Perú

Mario Carhuapoma-Yance

Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos., Perú

María A Alvarez-Paucar

Universidad Nacional Mayor de San Marcos., Perú

Sofía López Guerra

Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú

Revista Estomatológica Herediana, vol. 28, núm. 1, 2018

Universidad Peruana Cayetano Heredia, Perú

Recepción: 12 Octubre 2017
Aprobación: 27 Marzo 2018

DOI: <https://doi.org/10.20453/reh.v28i1.3281>

Redalyc: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=421558065005>

Resumen: Objetivos: Determinar la eficacia in vitro del efecto inhibidor del extracto etanólico de propóleo en comparación al gluconato de clorhexidina frente a cepas de *Lactobacillus acidophilus*. Material y Métodos: El tipo de investigación fue experimental, prospectivo, analítico y longitudinal, llevándose a cabo en el laboratorio de microbiología de la Universidad Privada Norbert Wiener durante el año 2016. La población estuvo conformada por cepas de *Lactobacillus acidophilus* de uso comercial, con una muestra de 30 cultivos en placas petri con agar base sangre, colocándose discos de papel Whatman N° 40 embebidos con extracto etanólico de propóleo al 15% y 30%, así como gluconato de clorhexidina 0,12% como control positivo y alcohol de 70° como control negativo. Se desarrolló el cultivo en condiciones de anaerobiosis a 37 °C. Resultados: Se obtuvo que la concentración al 15% y 30% del extracto etanólico de propóleo presenta un mayor efecto inhibidor promedio de 8,15 mm y 11,75 mm a las 48 horas y de 11,40 mm y 14,25 mm a las 72 horas, respectivamente; en relación al halo de inhibición promedio producido por el gluconato de clorhexidina al 0,12% a las 48 y 72 horas, que fue de 6,55 mm y 8,00 mm. Conclusiones: El extracto etanólico de propóleo al 30% es más efectivo in vitro que la clorhexidina al 0,12% para el control de *Lactobacillus acidophilus*.

Palabras clave: Caries dental, clorhexidina, *Lactobacillus acidophilus*, propolis.

Abstract: Objectives: To determine the efficacy in vitro of the antibacterial inhibitory effect of the ethanolic extracts of propolis in comparison to the chlorhexidine gluconate against strains of the *Lactobacillus acidophilus*. Material and methods: The type of investigation was experimental, prospective, analytical and longitudinal. It took place in the laboratory of microbiology at the private university Norbert Wiener during the year 2016. The population consisted of strains of *Lactobacillus acidophilus* commercial use and the sample consisted of 30 crops of this microorganism in petri plates with blood agar base and where disks embedded paper was placed with ethanol propolis extracts of 15% and 30%, chlorhexidine gluconate of 0.12% as a positive control and alcohol

of 70% as a negative control. Under conditions of anaerobiosis at 30°C. Results: The obtained that the concentration at 15% and 30% ethanolic propolis extract has a higher average effect inhibitor 8.15 mm and 11.75 mm at 48 hours and 11.40 mm and 14.25 mm at 72 hours respectively. In relation to the average inhibition halo produced by the chlorhexidine gluconate 0.12% at 48 and 72 hours, which was 6.55 mm and 8.00 mm. Conclusions: The ethanolic extract of propolis 30% is more effective in vitro than 0.12% chlorhexidine for the control of *Lactobacillus acidophilus*.

Keywords: chlorhexidine, dental caries, *Lactobacillus acidophilus*, propolis.

INTRODUCCIÓN

La caries dental es una enfermedad infecciosa y transmisible de los dientes (1). Es de origen multifactorial, donde interactúan: la dieta, la microflora (*Streptococcus mutans* y *Lactobacillus*) y el huésped (diente y la saliva) (2,3,4). Su principal característica es la desintegración de los tejidos calcificados del diente, para lograr esta desintegración, los microorganismos deben metabolizar los carbohidratos fermentables provenientes de la dieta ingerida y como resultado de esta metabolización se obtendrán ácidos que actuarán sobre la superficie dental generando la mencionada desintegración de tejidos (5). *Lactobacillus acidophilus* es un bacilo anaerobio facultativo o anaerobio estricto (6). Gram Positivo, catalasa negativo, no esporulado, pleomórfico, pero debido a que se dividen en un sólo plano, nunca presentan ramificaciones, suelen aparecer asociados en parejas, cadenas, empalizadas o frecuentemente aislados (7). En cuanto a los cultivos, la temperatura óptima es de 36±1 °C. Son muy acidogénicos y tolerantes al ácido (8,9), se asocian a las lesiones de caries a nivel de dentina (10), porque pasan a ser continuadores del proceso de caries iniciada por los *Streptococcus* del grupo mutans (11,12).

El propóleo es una resina natural elaborada por las abejas, cuya función es proteger a la colmena, evitando el crecimiento de bacterias y otros microorganismos patógenos (13). Generalmente es de color amarillo-marrón, pero varía según la zona geográfica (14).

El propóleo se compone aproximadamente de 50% a 55% de resinas y bálsamos, de 30% a 40% de cera, de 10% a 15% de aceites esenciales, de 5% de polen y de 5% de minerales (15,16). En sus componentes podemos mencionar que posee compuestos fenólicos: Flavonoides (17,18). Flavonas, isoflavonas y flavononas en un 50%, las cuales inhiben bacterias (19,20,21) y hongos (22). Siendo atribuido el poder antibacteriano del propóleo a los flavonoides presentes, este varía según la zona de recolección por parte de las abejas (23). Su mecanismo de acción antibacteriano está dado por la inhibición de la división celular, disrupción del ADN, desorganización de la membrana citoplasmática e inhibición de la síntesis de la pared celular, causando bacteriolisis parcial e inhibiendo la síntesis proteica (24). Por otro lado, Xiao et al., observaron que la formación del biofilm es vital para la progresión de la caries dental, por lo tanto, la inhibición de este factor de riesgo constituiría una alternativa para prevenir esta enfermedad (25). Cayo et al., evaluaron el efecto antibacteriano in vitro del propóleo sobre cultivos

de *Streptococcus mutans*; determinaron que el propóleo a partir de una concentración al 10% fue efectivo ante esta cepa (26).

Actualmente existen colutorios para el control de la placa dental, inhibiendo químicamente la formación o proliferación de esta. La clorhexidina al 0,12% es el agente antimicrobiano más utilizado dada su eficacia en la eliminación de microorganismos cariogénicos (27,28). Sin embargo, la clorhexidina presenta efectos adversos, tales como pigmentación dental de un color amarillo-marrón, cuando su uso sobrepasa los 14 días, sabor metálico, sensación de quemazón e incluso puede generar lesiones descamativas en la mucosa y úlceras en la gingiva (29,30). Por eso, se hace necesaria la búsqueda e implementación de nuevos agentes antiplaca que controlen y eliminen a los microorganismos causantes de la caries dental.

El presente estudio tuvo por objetivo evaluar el efecto inhibitorio del extracto etanólico de propóleo al 15% y 30% en comparación al gluconato de clorhexidina al 0,12% frente a cepas de *Lactobacillus acidophilus*.

MATERIAL Y MÉTODOS

El presente estudio fue de tipo experimental *in vitro*, mediante el método de difusión en disco placa, llamada también el método de Kirby-Bauer. Seleccionándose la bacteria asociada a la caries dental *Lactobacillus acidophilus* de uso comercial, presentación en ampolla y cuya procedencia fue del laboratorio LMB.H COLICHON®. Llevándose a cabo en el laboratorio de microbiología de la Universidad Privada Norbert Wiener, durante el año 2016. El propóleo fue obtenido bajo el control de calidad de un Químico Farmacéutico - UNMSM, durante el mes marzo del 2016, certificado por Hierbamiel Perú S.A.C. y de procedencia del valle de Oxapampa-Pasco, ubicado a 1814 msnm, luego, el propóleo en estado natural, fue trozado en pedazos pequeños y enseguida se depositó en un envase de vidrio ámbar conteniendo alcohol de 70°, de tal manera que el solvente cubriera todo los fragmentos del propóleo; se dejó en maceración a temperatura ambiente, protegido de toda fuente de luz y con agitación diaria durante una semana, enseguida se filtró (figura 1), luego, se llevó a estufa a 50°C, para evaporación del alcohol 70° y así obtener extractos concentrados de propóleo (figura 2).



Figura 1. Filtrado del extracto de propóleo macerado durante 7 días.

Figura 1.



Figura 2. Procedimiento de evaporación del alcohol en la estufa a 50°C

Figura 2.

Las sustancias experimentales obtenidas fueron el extracto etanólico de propóleo al 15% y 30%. Para los controles fueron utilizados el gluconato de clorhexidina al 0,12% como control positivo y alcohol etanólico 70° como control negativo (figura 3).



Figura 3. Sustancias obtenidas EEP al 15% y 30%, Clorhexidina 0,12% y alcohol de 70°

Figura 3.

La activación de la cepa fue realizada tomando una pequeña cantidad de la misma, contenida en la ampolla, con ayuda de una micropipeta hacia un tubo de ensayo que almacenaba caldo tioglicolato de sodio. Luego se colocó dentro de una jarra de anaerobiosis conjuntamente con un sobre generador de CO₂. Incubándola a 37°C en la estufa por 48 horas. Posteriormente para su replicación se realizó un sembrado en una placa petri con agar base sangre y se llevó a la estufa por 48 horas en las mismas condiciones de anaerobiosis. Luego se procedió a la observación

del *Lactobacillus acidophilus* a través de un microscopio óptico a un aumento de 100X (figura 4), después se tomó 4 colonias aisladas de la bacteria con un asa de siembra y se transfirió a un tubo de ensayo con 5ml de caldo de tripticasa de soya, controlando la turbidez del inóculo, hasta obtener la misma que la escala de Mc Farland 0,5. Para su posterior sembrado en las placas.

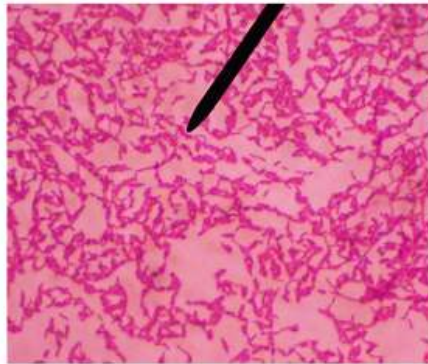


Figura 4. Vista de *Lactobacillus acidophilus* a un aumento de 100x

Figura 4.

La disposición de los antibacterianos en la placa petri se muestra en la figura 6.

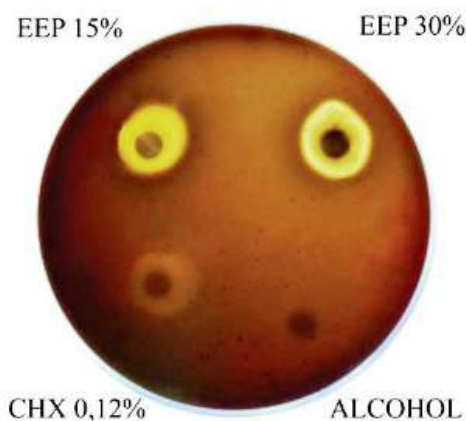


Figura 6. Disposición de discos y visualización de halos de inhibición

Figura 6.

La muestra estuvo conformada por 30 cultivos de *Lactobacillus acidophilus* (figura 4) en placas petri con agar base sangre y en donde se colocó discos de papel Whatman N° 40 estériles de 4 mm de diámetro, embebidos con 10 uL de extracto etanólico de propóleo al 15% y 30% así como gluconato de clorhexidina 0,12% y alcohol de 70° (figura 5). Bajo condiciones de anaerobiosis a 37 °C dentro de la incubadora.



Figura 5. Colocación de discos embebidos con sus respectivas sustancias.

Figura 5.

Finalmente a las 48 y 72 horas se midieron los respectivos halos de inhibición con el calibrador vernier (pie de rey) y los datos fueron consignados en las fichas de registro.

Para el análisis de los datos, se utilizó el programa estadístico IBM SPSS Statistics versión 23. Las pruebas estadísticas usadas fueron Kolmogorov-Smirnov para determinar la normalidad de las muestras, Wilcoxon para prueba de significancia estadística no paramétrica y la t-Student para prueba de significancia estadística paramétrica, utilizando un nivel de significancia $p < 0,05$.

RESULTADOS

Los halos de inhibición de los extractos etanólicos de propóleo al 15% y 30% sobre las cepas de *Lactobacillus acidophilus* no presentaron distribución normal; mientras tanto el gluconato de clorhexidina al 0,12% presentó distribución normal, mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. El extracto etanólico de propóleo (EEP) al 15% presentó una media de 8,15mm, con una desviación estándar (D.S) 0,63 mm a las 48 horas y una media de 11,40mm, con una D.S de 1,12 mm a las 72 horas, encontrándose una diferencia significativa de $p < 0,022$ para ambas muestras (tabla 1).

Tabla 1. Comparación de medias de los halos de inhibición del EEP al 15% frente a cepas de *Lactobacillus acidophilus* a las 48 y 72 horas.

Tiempo	n	Eficacia antimicrobiana		
		Media (mm)	D.S (mm)	K-S
48 Horas	30	8,15	0,63	0,022*
72 Horas	30	11,40	1,12	0,022*

*Prueba de Kolmogorov-Smirnov $p = 0,022 < 0,05$

Tabla 1.

El EEP al 30% presentó una media de 11,75 mm, con una desviación estándar (D.S) de 0,74mm a las 48 horas y una media de 14,25 milímetros,

con una desviación estándar de 0,82 mm a las 72 horas. Encontrándose una diferencia significativa de $p < 0,011$. Para ambas muestras (tabla 2).

Tabla 2. Comparación de medias de los halos de inhibición del EEP al 30% frente a cepas de *Lactobacillus acidophilus* las 48 y 72 horas.

Tiempo	n	Eficacia antimicrobiana		
		Media (mm)	D.S (mm)	K-S
48 Horas	30	11,75	0,74	0,011*
72 Horas	30	14,25	0,82	0,011*

*Prueba de Kolmogorov-Smirnov $p = 0,011 < 0,05$

Tabla 2.

El gluconato de clorhexidina al 0,12% presentó una media de 6,55 mm, con una desviación estándar (D.S) de 0,15 mm a las 48 horas y una media de 8,00 mm, con una D.S de 0,72 mm a las 72 horas. Encontrándose una diferencia significativa de $p < 0,051$ para ambas muestras (tabla 3).

Tabla 3. Comparación de medias de los halos del gluconato de clorhexidina 0,12% frente a cepas de *Lactobacillus acidophilus* las 48 y 72 horas.

Tiempo	n	Eficacia antimicrobiana		
		Media (mm)	D.S (mm)	K-S
48 Horas	30	6,55	0,15	0,051*
72 Horas	30	8,00	0,72	0,051*

*Prueba de Kolmogorov-Smirnov $p = 0,000 < 0,05$

Tabla 3.

Se usó la prueba de Wilcoxon para muestras independientes para los extractos etanólicos de propóleo (EEP) al 15%, 30% y prueba T para gluconato de clorhexidina 0,12% a las 48 y 72 horas, hubo diferencia significativa $p < 0,05$ (tabla 4). Observándose la medida de los halos de inhibición por el efecto de los EEP al 15% y 30% comparados con el gluconato de clorhexidina al 0,12% y etanol 70° frente al *Lactobacillus acidophilus* (gráfico 1).

Tabla 4. Halos de inhibición generados por los extractos etanólicos de propóleo al 15%, 30% y el gluconato de clorhexidina 0,12% frente a *Lactobacillus acidophilus* las 48 y 72 horas.

Sustancia	Tiempo 48 Horas			Tiempo 72 Horas		
	Media	D.S.	p	Media	D.S.	p
	(mm)	(mm)		(mm)	(mm)	
EEP 30%	11,75	0,74	0,000*	14,25	0,82	0,000*
EEP 15 %	8,15	0,63	0,000*	11,40	1,12	0,000*
CHX 0,12%	6,55	6,55	6,55	8,00	0,72	0,000**
Alc 70°	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,000**

* Prueba de Wilcoxon p=0,000<0,05 existe diferencia estadísticamente significativa a las 48 Y 72horas.

** Prueba t de Student p=0,000<0,05 existe diferencia estadísticamente significativa a las 48 y 72 horas.

Tabla 4.

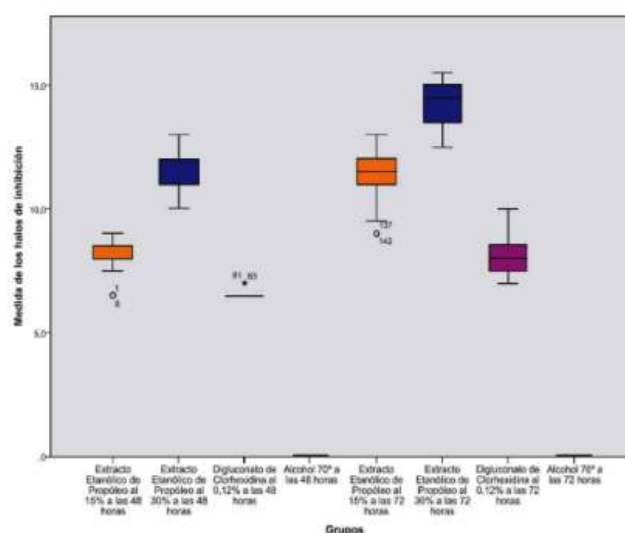


Gráfico 1. Medidas de los halos de inhibición por el efecto de los EEP al 15% y 30% a las 48 y 72 horas.

Gráfico 1.

DISCUSIÓN

En el presente estudio de tipo experimental se buscó evaluar el efecto inhibitorio in vitro del EEP al 15% y 30% sobre cepas de *Lactobacillus acidophilus* con gluconato de clorhexidina al 0,12%.

Según León et al., los cuales realizaron un estudio sobre el efecto inhibitorio del EEP sobre *Candida albicans*, *Candida glabrata* y *Candida krusei* determinando que el extracto etanólico de propóleo al 5% y 25% presento efectividad antifúngica ante *Candida glabrata* y *Candida krusei* respectivamente (22).

Díaz et al., demostraron el efecto antibacteriano del EEP al 1%, 5% y 10% frente a cepas de *Porphyromonas gingivalis* y *Fusobacterium nucleatum* en comparación del gluconato de clorhexidina al 0,2%. Encontrando que el EEP al 10% presenta mayor actividad antibacteriana que el gluconato de clorhexidina al 0,2% frente a *P. Gingivalis* (20); por

otro lado, Mayta et al., evaluaron el efecto antibacteriano del EEP al 10 y 30%. Sobre cepas de *Streptococcus mutans* y *Staphylococcus aureus*. Encontrando que fue menor su efecto inhibitorio que el gluconato de clorhexidina al 0,05% y 0,12% frente a cepas de *Streptococcus mutans* (21). Este trabajo determinó que el extracto etanólico de propóleo al 30% presentó mayor efecto inhibidor sobre cepas de *Staphylococcus aureus* en comparación al gluconato de clorhexidina al 0,05%.

Eguizábal et al., realizaron un estudio en el que se usó concentraciones menores demostrando su actividad antimicrobiana del EEP al 0,8%, 20% y 30% en comparación a la clorhexidina al 0,12% frente a cepas de *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus casei* en una muestra de 10 placas para cada cepa, demostrando que a partir de una concentración de 0,8% de EEP ejerce actividad antibacteriana (19). Cayo et al., realizaron un estudio in vitro donde se evaluó el efecto antibacteriano del propóleo frente a cepas de *Streptococcus mutans*, determinando que a partir de una concentración al 10% de propóleo ejerce acción antibacteriana (26). Sin embargo el estudio de Akca et al., revelaron que el EEP podría ser tan eficaz como la clorhexidina en Bacterias cariogénicas, aunque el efecto bactericida de EEP fue mejor que el de la clorhexidina en *L. acidophilus*, *L. salivarius* subsp. *salivarius* y *P. intermedia* (31). Estos resultados acerca del EEP en menores concentraciones difieren con nuestro estudio in vitro donde se observó que el EEP al 30% presentó mayor efecto inhibitorio.

El presente trabajo busca brindar una alternativa de solución al problema más prevalente de salud oral del país, que sigue la línea de investigación correspondiente al uso de los productos naturales, mediante la aplicación de agentes que controlen los factores de riesgo de la caries dental, como el propóleo, aprovechando nuestro recurso natural y su fácil accesibilidad.

En conclusión, la investigación encontró que el extracto etanólico de propóleo al 30% obtuvo mayor efecto inhibitorio in vitro frente a la cepa de *Lactobacillus acidophilus* al cabo de 48 y 72 horas cuando se le comparó con el gluconato de clorhexidina al 0,12%.

Referencias

1. Gonzáles A, Gonzáles B, Gonzáles E. Salud dental: relación entre caries dental y el consumo de alimentos. *Nutr Hosp.* 2013;28(4):64-71.
2. Oda Y, Hayashi F, Okada M. Longitudinal study of dental caries incidence associated with *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in patients with intellectual disabilities. *BMC Oral Health.* 2015;15(1):102.
3. Cura F, Palmieri A, Girardi A, Martinelli M, Scapoli L, Carinci F. Lab-Test 4: dental caries and bacteriological analysis. *Dent Res J (Isfahan).* 2012;9(Suppl2):139-41. doi:10.4103/1735-3327.109723
4. Takahashi N, Nyvad B. Caries ecology revisited: microbial dynamics and the caries process. *Caries Res.* 2008; 42(6):409-18.
5. Menéndez L, Miranda de Zela P. Análisis comparativo de índices de caries dentales a partir de muestras de sitios arqueológicos del Holoceno tardío

- de la República Argentina. Rev Arg Antrop Biol. 2017;19(2): 0-0. DOI: <https://doi.org/10.17139/raab.2017.0019.02.03>
6. Pérez R, Carrasco M. Crecimiento in vitro de *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus acidophilus* en medios que contengan edulcorantes artificiales. Kiru.2006;3(1):2-6.
7. Liébana J. Microbiología Oral. Madrid: McGraw Hill; 2002.
8. Maraví G. Efecto antibacteriano y antifúngico del aceite esencial de *Mentha piperita*, *Origanum vulgare* y *Cymbopogon citratus* sobre *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus* y *Candida albicans*. Tesis para optar título de Cirujano Dentista. Lima, Perú: Universidad Privada Norbert Wiener; 2012.
9. Konemam E, Allen S, Janda W. Diagnóstico microbiológico. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2008.
10. Uzer E, Tunac A, Ates M, Sen B. Antimicrobial activity of different disinfectants against cariogenic microorganisms. Braz Oral Res. 2016; 30(1):1-6.
11. Negroni M. Microbiología estomatológica fundamentos y guía práctica. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2009.
12. Evans A, Leishman S, Walsh L, Seow W. Inhibitory effects of antiseptic mouth rinses on *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis* and *Lactobacillus acidophilus*. Aust Dent J. 2015; 60(2):247-54.
13. Samet N, Laurent C, Susarla SM, et al. The effect of bee propolis on recurrent aphthous stomatitis: a pilot study. Clin Oral Investig. 2011; (2):143-47.
14. Botanical online. Propoleo: Característica del propoleo. Lima: Botanical online; 2015.
15. Vechi E, Drago L. Propolis antimicrobial activity: what's new? Infez Med. 2007;15(1):7-15
16. Borrelli F, Maffia P, Pinto L, et al. Phytochemical compounds involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract. Fitoterapia. 2002;73(1): 53-63.
17. Sánchez I, Rubio A. Atención farmacéutica en la enfermedad periodontal (yII). Plantas medicinales. Of- farm. 2010;29(4):62-7.
18. Abderrahim L, Abdellah F, Boukraa L. The Importance of Botanical Origin for Api-products as Antibiotics. Anti-Infective Agents. 2015;13(1): 28-35.
19. Eguizábal M, Moromi H. Actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de propóleo peruano sobre *Streptococcus mutans* y *Lactobacillus casei*. Odontol Sanmarquina. 2007; 10(2): 18-20.
20. Díaz J, Proaño-de Casalino D. Actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de propóleo de Oxapampa-Perú, sobre cepas de *Porphyromonas gingivalis* y *Fusobacterium nucleatum*. Rev Estomatol Herediana. 2011;21(3):125-30.
21. Mayta F, Sacsquispe S. Evaluación in vitro del efecto antibacteriano del extracto etanólico de propóleo de Oxapampa - Perú sobre cultivos de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) y *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Rev Estomatol Herediana. 2010; 20(1):19-24.
22. León G, Sacsquispe S, Zurita S. Efecto antifúngico in vitro sobre el crecimiento en *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida glabrata* ATCC 90030 y *Candida krusei* ATCC 6258, expuestas al propóleo de

- Oxapampa a las 24, 48 y 120 horas. Revista de Investigación de la Universidad Privada Norbert Wiener. 2014; 3(1):23-9.
23. Reyes C. Actividad antibacteriana in vitro del extracto etanólico de propóleo sobre cultivos de bacterias anaerobias frecuentes en pacientes con periodontitis crónica. Tesis para optar título de Cirujano Dentista. Lima, Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2012.
 24. López J, Ubillús M. Estandarización del propóleo de la provincia de Oxapampa, departamento de Pasco(Perú) como materia prima para su utilización a nivel industrial. Tesis para optar título de Químico Farmacéutico. Lima, Perú: Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2004.
 25. Barrientos L, Herrera CL, Montenegro G, Ortega X, Veloz J, Alvear M, et al. Chemical and botanical characterization of Chilean propolis and biological activity on cariogenic bacteria *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. Braz J Microbiol. 2013; 44(2):577-85.
 26. Cayo C, Quijandría L, Ramos J. Evaluación in vitro del efecto antibacteriano del propóleo sobre cultivos de *Streptococcus mutans*. Ciencia y Desarrollo UAP. 2016;19(2):19-24.
 27. Cuencas E, Baca P. Odontología preventiva y comunitaria. Principios, métodos y aplicaciones. Barcelona: Masson; 2013.
 28. Mayta F, Ruiz S, Pacheco R, Valderrama S, Villegas M. Papel de la clorhexidina en la prevención de las infecciones asociadas a la atención en salud. Infectio. 2011;15(2):98-107.
 29. Aoun G, Saadeh M, Berberi A. Effectiveness of Hexetidine 0.1% compared to Chlorhexidine Digluconate 0.12% in eliminating *Candida albicans* colonizing dentures: A randomized clinical in vivo study. J Int Oral Health. 2015;7(8):5-8.
 30. Soares J, Goldberg F. Endodoncia Técnica y fundamentos. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2002.
 31. Akca E, Akca G, Topçu FT, Macit E, Pıkdöken L, Özgen F. The comparative evaluation of the antimicrobial effect of Propolis with Chlorhexidine against oral pathogens: An in vitro study. BioMed Research International. 2016;2016: 1-8. doi:10.1155/2016/3627463.