



## Comparación de la efectividad antimicrobiana *in vitro* de un extracto hidroalcohólico de propóleo y un enjuague basado en cloruro de Cetilpiridinio: Un tamizaje piloto

### *In vitro* comparison of the antimicrobial effectiveness of a hydroalcoholic extract of propolis and cetilpyridinium chloride-based mouthwash

Daniela Arroyave López<sup>1</sup>, María Camila Molina Restrepo<sup>1</sup>, Jorge Mauricio Ramírez Cadavid<sup>1</sup>, Laura Valentina Vallejo Aristizábal<sup>1</sup>, Valentina Vélez Arias<sup>1</sup>, Alejandro Peláez Vargas<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidad Cooperativa de Colombia, Facultad de Ciencias de la Salud, Odontología, Medellín y Envigado.

#### **RESUMEN**

**Contexto:** La placa bacteriana es una de las principales causas de enfermedades orales tales como caries dental, enfermedad periodontal y gingivitis. Recientemente, se han venido implementando estrategias para su prevención y tratamiento que incluyen productos naturales para reemplazar productos químicos disponibles en el mercado. **Objetivo:** Comparar la actividad antimicrobiana *in vitro* sobre *S. mutans* de un extracto hidroalcohólico de propóleo y un enjuague basado en Cloruro de Cetilpiridinio. **Materiales y métodos:** Se evaluaron dos grupos experimentales así: a) Extracto hidroalcohólico de propóleo y b) un enjuague comercial de Cloruro de Cetilpiridinio. Se realizaron pruebas de halos de inhibición por 24 horas, crecimiento basado en unidades formadoras de colonias (UFC) y curvas de crecimiento cada 20 minutos durante 18 horas. **Resultados:** La concentración mínima inhibitoria del extracto hidroalcohólico de propóleo fue del 5%, los halos de inhibición de los extractos etanólicos sobre las cepas de *S. mutans* tuvieron un halo de inhibición de 7.5mm que corresponde al 44.1% del control positivo. Con respecto a la curva de crecimiento bacteriano, el extracto etanólico de propóleo demostró un efecto inhibitorio a partir de las 2h en 10%. **Conclusiones:** Al cabo de 24 horas de incubación se observó que el extracto etanólico de propóleo al 5% produjo un 98.6% de Inhibición y a una concentración del 7% tiene un efecto bactericida.

**PALABRA CLAVE:** Adherencia bacteriana, enjuague, propóleos, cloruro de Cetilpiridinio, *S. mutans*.

#### **ABSTRACT**

Background. Oral diseases such as tooth decay, periodontal disease and gingivitis are caused by dental biofilm. Currently, natural based oral care products are easily available to control dental biofilm formation. Objective: To compare the antimicrobial activity of a hydroalcoholic extract of propolis and a mouthwash based on Cetylpyridinium Chloride on *S. mutans* cultures. Materials and methods: Two experimental groups were evaluated: a) Hydroalcoholic extract of propolis and b) a commercial Cetylpyridinium Chloride mouthwash.



Zone inhibition tests for 24 hours, proliferation based on colony forming units (CFU) and growth curves every 20 minutes for 18 hours were obtained. Results: The minimum inhibitory concentration of the hydroalcoholic extract of propolis was 5% and a 7.5mm inhibition zone, which corresponds to 44.1% of the positive control, was observed. Ethanolic extract of propolis showed a 10% inhibitory effect after 2h on the *S. mutans* growth curve. Conclusions: Ethanolic extract propolis (5%) produced 98.6% inhibition and a concentration of 7% demonstrated a bactericidal effect.

**KEY WORDS:** adherence, rinse, propolis, cetylpyridinium chloride, *S. mutans*.

## INTRODUCCIÓN

La caries dental es una enfermedad multifactorial relacionada con la dieta alta en carbohidratos, la composición y capacidad buffer de la saliva, la presencia de microorganismos cariogénicos, un sustrato adecuado, la higiene oral, la presencia de fluoruros, susceptibilidad, las enfermedades sistemas del paciente y la presencia de placa bacteriana (1).

La cavidad bucal constituye un medio ideal para el crecimiento y desarrollo de las biopelículas dentales, dadas características tales como la humedad, la temperatura constante y un pH que está próximo a la neutralidad, en estas condiciones existen diferentes grupos de microorganismos que interactúan para formar la placa bacteriana (2).

Las biopelículas maduran para convertirse en estructuras complejas compuestas por una gran variedad de microorganismos aerobios y anaerobios que se encuentran rodeados de una matriz intercelular de polímeros de origen bacteriano y salival. (2).

Existen diferentes clasificaciones de la biopelícula, por su capacidad patogénica agrupada en dos grupos (cariogénica o periodontal) y según su ubicación (subgingival o supragingival). dándose por la acidificación prolongada de la microflora y de la desmineralización del diente (3).

La biopelícula oral es la causa principal de gingivitis, periodontitis, caries, halitosis y enfermedades sistémicas, por lo tanto, la inhibición de este factor de riesgo podría ser una de las mejores alternativas para prevenir esta enfermedad (4).

Para el control de la biopelícula se han estudiado e implementado diferentes estrategias para prevenir, evitar y controlar su evolución tales como el cepillado, el uso de la seda dental, los dentífricos y enjuagues antimicrobianos, los cepillos eléctricos, los limpiadores de lengua, la profilaxis profesional, el uso de sellantes en fosas y fisuras, la topicación de flúor y la educación sobre la ingesta de azúcares y carbohidratos (5).

Los enjuagues se pueden clasificar de acuerdo con el componente químico principal en antisépticos, bisguanídicos (Clorhexidina), fluoruros (estañoso, sódico y fluoruro



de amina) y por último los compuestos de amonio cuaternario como el Cloruro de Cetilpiridinio (CPC). Se ha reportado que el CPC tiene un efecto antimicrobiano sobre las bacterias Gram positivas y Gram negativas, sobre hongos como la *C. albicans* y los virus como influenza (6).

Los principales efectos secundarios son la coloración de la boca, la lengua y una leve irritación de las mucosas orales (7). Efectos adversos que comparte con la clorhexidina que adicionalmente produce una alteración temporal del gusto específicamente el sabor amargo y salado, y provoca dolor, irritación, descamación leve, ulceraciones de las mucosas y sensación de ardor en la lengua (8).

Debido a los diferentes efectos secundarios de los productos químicos más utilizados, se ha planteado la utilización de productos naturales, ya que estos tienen propiedades antimicrobianas similares con una menor presencia de efectos secundarios (9). Los productos naturales más utilizados para el cuidado y la higiene de la cavidad oral son los extractos de la manzanilla (10), el cacao, el aloe vera, la moringa, el orégano, el coco, el ajo, el clavo, el cardamomo, la stevia, la miel de las abejas y el propóleo (11).

Algunas aplicaciones de los productos naturales comprenden el tratamiento del dolor dental, las aftas, la halitosis y la estomatitis debido a propiedades medicinales como asepsia, desinfección y analgesia que producen los clavos (12). La manzanilla es utilizada como tratamiento de la enfermedad periodontal por su efecto analgésico y anti inflamatorio (13). También se ha descrito que la granada es eficaz para combatir las bacterias Gram positivas y Gram negativas que forman la biopelícula oral (14).

El propóleo es un producto recolectado por las abejas y que es formado debido a las excreciones resinosas de las yemas y corteza de árboles y arbustos (15). En estudios previos el propóleo ha demostrado ser un producto natural que posee propiedades antibióticas, cicatrizantes, antiinflamatorias, analgésicas, antialérgicas y anestésicas (16).

Sus propiedades varían con la composición, que es afectada por diferentes factores como la geografía, la época de colecta, el entorno ecológico, las especies vegetales de las cuales se extraen las resinas y los lugares con altas temperaturas (17), ya que en estos lugares se encuentra una mayor cantidad de flora, brindándole al propóleo mayores propiedades en comparación con los propóleos que se encuentran en lugares con temperaturas bajas donde hay una menor cantidad de flora (18).

El presente estudio tiene como objetivo comparar la actividad antimicrobiana *in vitro* sobre *S. mutans* de un extracto hidroalcohólico de propóleo y un enjuague basado en Cloruro de Cetilpiridinio.



## MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio piloto experimental *in vitro* se evaluaron dos grupos a) Extracto hidroalcohólico comercial de propóleo al 10% (El Melario, Colombia) y b) un enjuague comercial de Cloruro de Cetilpiridinio al 0.075% (Colgate Plax sin Alcohol, Argentina), como control positivo se usó clorhexidina (Clorhexol 0.2%, Colombia) y solución salina como control negativo.

Se realizaron cultivos de *S. mutans* (ATCC 25175) que fueron precultivados a 37°C en medio BHI (Brain Heart Infusion) bajo condiciones microaerófilas con una atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. A las 24 horas las colonias fueron suspendidas en medio BHI enriquecido con 5% de sacarosa y llevadas a una concentración de 90±5 NTU (1x10<sup>8</sup> UFC/mL).

Para evaluar el efecto antimicrobiano se utilizaron los métodos de difusión por disco, curvas de crecimiento y proliferación basada en unidades formadoras de colonias.

Para el método de difusión por disco, el *S. mutans* previamente preparado fue sembrado en placas de Agar Mueller Hinton (MH) donde se distribuyeron discos de papel filtro de 5mm de diámetro, impregnados con 10µL de los extractos a evaluar, se utilizó solución salina como control negativo y clorhexidina al 0,02% y ETOH como control positivo. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 horas y se midió el diámetro de la Zona de Inhibición de crecimiento (IZ) en milímetros con el uso del software ImageJ (NIH, USA).

Las curvas de crecimiento bacteriano se realizaron en placas de 96 pozos de poliestireno (Costar®, USA), con un medio BHI inoculado con *S. mutans* en una concentración de 1x10<sup>8</sup> UFC/ml, preparado como se explicó anteriormente. En cada pozo se adicionó una mezcla de medio inoculado y propóleo en diferentes porcentajes (10%, 8%, 6%, 4%, 2%, 1%, 0.5%), El CPC se usó según la presentación comercial. Se realizaron lecturas cada 20 minutos durante al menos 18 horas en un espectrofotómetro (Multiskan GO, Thermo Scientific, USA) a una longitud de onda de 600nm.

Para el crecimiento basado en unidades formadoras de colonias (UFC) se preparó un stock 1x10<sup>8</sup> UFC/ml 90±5 NTU, y se realizaron diluciones del propóleo al (10%, 8%, 6%, 4%, 2%, 1%, 0.5%), CHX al 0.2% y CPC al 0.075%, como control negativo se usó solución salina. Se incubaron a 37°C al 5% de CO<sub>2</sub> durante 10 minutos, se toman 10uL de cada una de las concentraciones realizando la técnica de diluciones seriadas hasta 1x10<sup>5</sup> UFC/ml. Posteriormente se utiliza la técnica de la gota cualitativa y cuantitativa, se sembraron 10uL y se incubaron a 37°C durante 24 horas. Finalmente, se tomaron fotografías y se hicieron conteos de UFC/ml.

Todos los resultados se analizaron utilizando medidas de tendencia central y fueron graficados en una hoja de cálculo.

## RESULTADOS

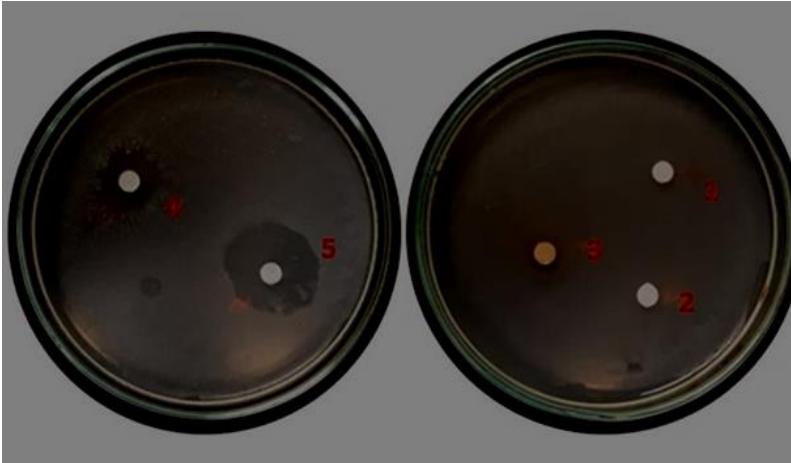


Figura 1. Halos de inhibición de las diferentes soluciones evaluadas (1) etanol (ETOH), (2) Solución salina, (3) Propóleo, (4) Clorhexidina, (5) Cloruro de Cetilpiridinio.

La figura 1 muestra un ensayo de halos de inhibición a 48h, el propóleo presentó un halo de 7.5mm que corresponde al 44.1% del control positivo y el halo de CPC fue 23.9mm que corresponde al 140% del control positivo.

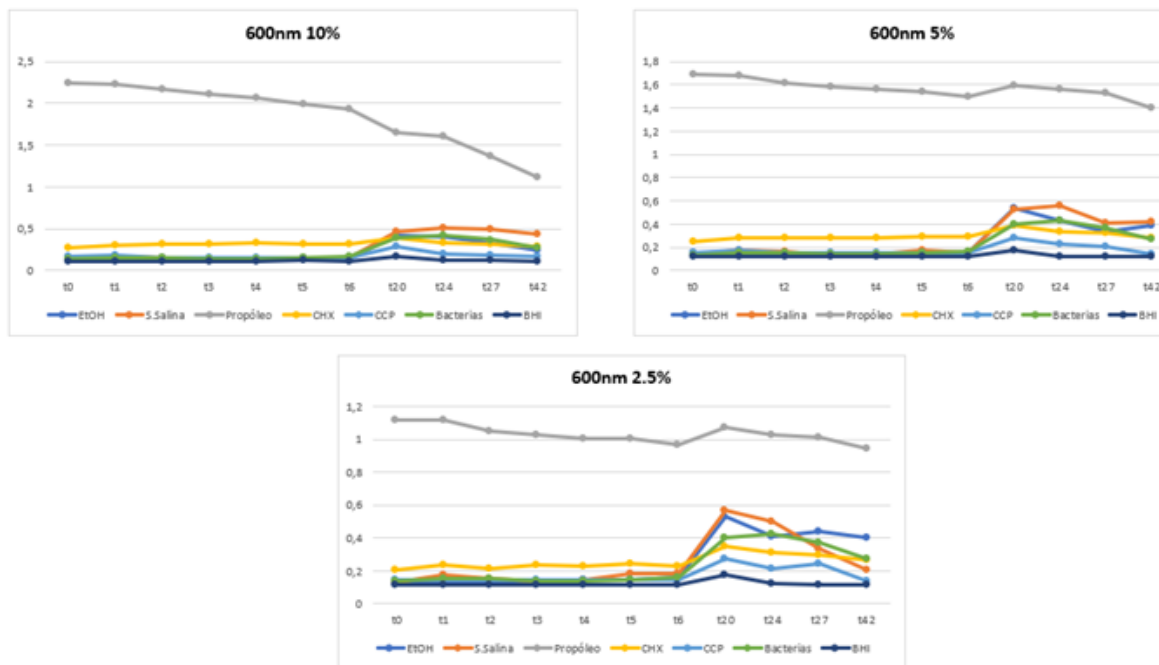
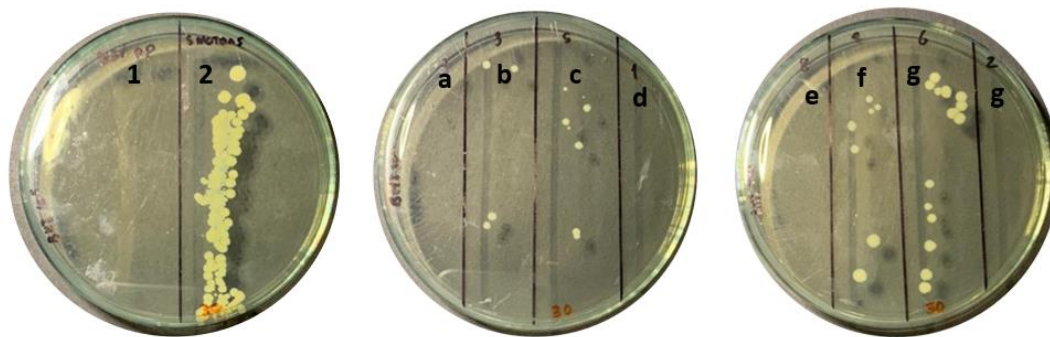
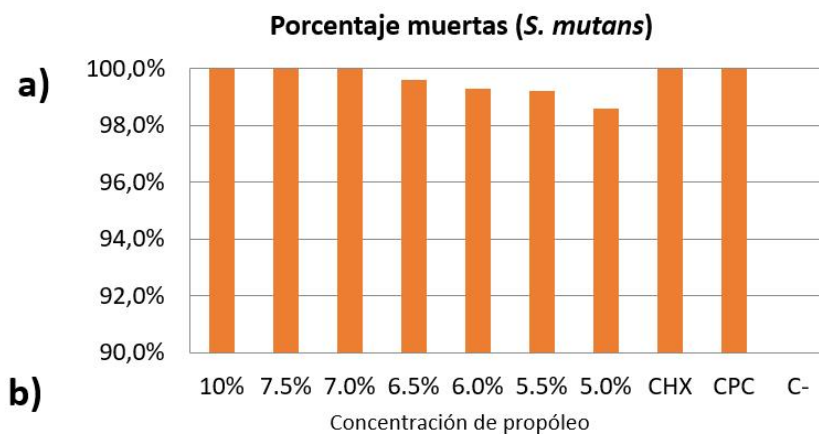


Figura 2. Curva de crecimiento bacteriano leídas a 600nm con propóleo al 10%, 5% y 2.5%.

En la figura 2 se observa como la solución del extracto etanólico de propóleo mostro un efecto inhibitorio a partir de las 2h especialmente para 10% que decrece, lo que podría explicarse debido al índice de oxidación del producto. Se observa en las curvas de crecimiento bacteriano de seguimiento de 42 horas, que aparentemente los efectos bacteriostáticos se detienen a las 6h.



**Figura 3.** a) Se observa el comportamiento de inhibición del crecimiento a diferentes porcentajes de propóleo. b) Propóleo 10% (1), solución salina (2), a) CPC 6%, b) propóleo 5%, c) propóleo 7%, d) CHX e) propóleo 6.5% f) propóleo 5.5%, g) propóleo 7.5%, h) CHX.

En la figura 3b se observa la concentración mínima inhibitoria del extracto hidroalcohólico de propóleo, el cual a partir del 5% se registró una mínima formación de colonias mostrando una disminución de UFC en un 98.6%, Otra de las concentraciones estudiadas del extracto hidroalcohólico de propóleo es al 7% en el cual se observó una inhibición del 100%.



## DISCUSIÓN

El presente estudio está enmarcado en una línea de investigación que busca alternativas para el control de la formación de la biopelícula que contribuye a la formación de enfermedades orales a partir del uso de productos naturales como el propóleo. En el estudio se compara la actividad antimicrobiana *in vitro* sobre *S. mutans* de un extracto hidroalcohólico de propóleo y un enjuague basado en Cloruro de Cetilpiridinio.

Serrano y col, se enfocaron en evaluar el desarrollo, propiedades y resistencia de las biopelículas. Ellos evaluaron varios modelos de estudios tanto *in vitro* como *in vivo* y lograron demostrar que los colutorios con clorhexidina son los más efectivos en su acción bactericida sobre las biopelículas y que otros colutorios basados en sustancias tales como (los aceites esenciales, la octenidina, el fluoruro estaño y la hexetidina), mostraron una menor acción bactericida. (3).

En un estudio realizado por James y col, se evaluó la efectividad del enjuague bucal con clorhexidina a diferentes concentraciones (0,1%, 0,5%, 0,6% y 0,12%), en el cual se incluyeron ensayos controlados aleatorios de pacientes con gingivitis o periodontitis y un grupo de pacientes sanos, los resultados obtenidos mostraron una gran reducción de placa dental con el enjuague bucal de clorhexidina al 0,5% o al 0,6%, utilizado como complemento de los procedimientos mecánicos de higiene bucal. Sin embargo, no hubo evidencia de que una concentración de enjuague con clorhexidina sea más eficaz que otra (8).

Wassel y Mariem O., evaluaron la actividad antimicrobiana de barnices dentales que contenían extracto hidroalcohólico de propóleo a partir de la técnica de difusión por disco sobre cultivos de *S. mutans* en medio BHI durante 48 horas. Sus resultados demostraron que todos los barnices que contienen propóleo inhibieron el crecimiento significativamente comparados con los barnices sin propóleo. Estos resultados coinciden con el presente estudio donde se realizó la misma técnica de difusión por disco y se encontró una inhibición del crecimiento del *S. mutans* (ATCC 25175) a las mismas 48 horas, sin embargo, en el estudio anterior no son comparadas diferentes concentraciones, sino que el propóleo es comparado directamente con barnices que contienen componentes diferentes (19).

Herrera D, y cols evaluaron los efectos clínicos microbiológicos basados en los pacientes con uso de una pasta dental y enjuague bucal con (CPC) en pacientes con ortodoncia, donde se demuestra que este enjuague tuvo un efecto moderado sobre la reducción de la placa y la gingivitis, aunque no se observaron aumentos en la tinción de los dientes (7).

López y cols, analizaron varios estudios *in vitro* donde se demuestra la actividad bacteriostática y bactericida del propóleo con una concentración mínima inhibitoria del 0.93% para las bacterias Gram positivas y 7.5 % para las Gram negativas. En relación con el presente estudio evidentemente se observa coincidencia con la bacteria de interés, en este caso la *S. mutans*, obteniendo como resultado un efecto bacteriostático y bactericida a una concentración de 7% (16).

Benítez N y col, evaluaron la actividad antimicrobiana de dos extractos etanólicos



de propóleo (EEP) provenientes de apiarios de los municipios de Totorò y Buenos Aires en el Departamento del Cauca, frente a una bacteria Gram positiva y Gram negativa y determinaron la composición cualitativa de los metabolitos secundarios de los dos extractos. El estudio arrojó la presencia de variaciones en el perfil cromatográfico de los dos extractos, observándose que el (EEP) de Buenos Aires tuvo mayor variedad de compuestos químicos que el de Totorò. El resultado confirma la importancia de evaluar la composición química de los propóleos para su efectiva acción antimicrobiana, ya que las diferencias de la composición pueden estar determinadas por la diversidad de la flora predominante en cada zona biogeográfica donde están situados los apiarios (18).

Nagappan, explico qué la clorhexidina presenta mayores propiedades antibacterianas que los enjuagues a base de propóleo. Estos datos con los datos obtenidos en el presente proyecto, donde se observó un mayor efecto de la clorhexidina, pero se encontró que en diferentes concentraciones se pueden obtener efectos bactericidas. No se puede dejar a un lado que los efectos estos depende de factores como el lugar donde se consigue, la temporada del año en que es recolectado, especie de abeja y la contaminación del propóleo con cera (4).

Para la determinación de la actividad antibacteriana del propóleo sobre las bacterias *S. mutans*, en el estudio de Veloz y col. evaluaron la concentración mínima inhibitoria, y el método de dilución en serie inoculado en 96 pozos en diferentes concentraciones, utilizando de igual forma a la clorhexidina al 0.2% (control positivo) y medio de cultivo (control negativo) y todos los ensayos fueron incubados por 48 horas. Ellos demostraron una reducción significativa de la actividad metabólica de las bacterias. Sin embargo en el presente estudio se encontró un efecto bactericida a una concentración mínima inhibitoria a partir del 5% (15).

Eguizábal realizó 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 *S. mutans* y *Lactobacillus casei*. los resultados obtenidos fueron que a una concentración de 0,8% de EEP ejerce actividad antibacteriana. Sin embargo, a comparación del presente estudio la cepa de *S. mutans* cuando se le aplicó el extracto de propóleo se encontró que las primeras 24 horas para tener un efecto antimicrobiano se tuvo que utilizar una concentración del 5% (20).

## CONCLUSIONES

La actividad antimicrobiana del extracto etanólico de propóleo se observó al cabo de 24 horas a una concentración mínima inhibitoria del 5% con un porcentaje de 98.6% y una eliminación del 100% de las bacterias a una concentración de 7% sobre cultivos de *S. mutans*.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores manifiestan sus agradecimientos a la Profesora Claudia Bedoya por sus importantes aportes al refinamiento de la metodología y la interpretación de los resultados.





## BIBLIOGRAFIA

1. Hidalgo-Gato Fuentes I, De Estrada Riverón JD, Pérez Quiñones JA. La caries dental. Algunos de los factores relacionados con su formación en niños. *Revista Cubana de Estomatología*. 2008;45(1):1–12.
2. Baños R F, Aranda J R. Placa dentobacteriana. *Revista de la Asociación Dental Mexicana*. 2003;LX(1):34–6.
3. Serrano-Granger J, David H. La placa dental como biofilm. ¿Como eliminarla? *Rcoe*. 2005;10(4):431–9.
4. Nazeri R, Ghaiour M, Abbasi S. Evaluation of Antibacterial Effect of Propolis and Its Application in Mouthwash Production. *Frontiers in Dentistry*. 2019;16(1):1–12.
5. Macias G, Ameliza L, Carballo C, Liset. Estrategias preventivas en salud oral para niños en edad escolar. *Uniandes ciencias de la salud*. 2011;2(3):213–29.
6. Lu J, Zhao Z, Xu C, Duan A, Zhang P. Antibacterial activity of propolis against staphylococcus aereus. *International Journal of food microbiology*. 2005;14(4):213–20.
7. Herrera D, Escudero N, Pérez L, Otheo M, Cañete-Sánchez E, Pérez T, et al. Clinical and microbiological effects of the use of a cetylpyridinium chloride dentifrice and mouth rinse in orthodontic patients: A 3-month randomized clinical trial. *European Journal of Orthodontics*. 2018;40(5):465–74.
8. James P, Worthington H V., Parnell C, Harding M, Lamont T, Cheung A, et al. Chlorhexidine mouthrinse as an adjunctive treatment for gingival health. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2017;2017(3).
9. Santana Fernández KA, Rey Ferrales Y, Rodríguez Ricardo E, Silva Colomé ME, Rodríguez Hung AM. Aplicación de la medicina tradicional y natural en las urgencias de prótesis estomatológicas. *Revista Archivo Médico de Camagüey*. 2015;19(3):297–306.
10. Gaete Forno MJ, Oliva Mella P. Efectividad del Colutorio de Manzanilla Comparado con Placebo y Clorhexidina en Pacientes con Gingivitis entre 19 y 25 Años: Ensayo Clínico Controlado. *International Journal of Odontostomatology*. 2012;6(2):151–6.
11. Zambrano TB santos-, Jaime-Szwom R, Ameida RS. Natural compounds to reduce the bacterial load in the oral cavity: a review article. *Biotempo*. 2020;17(1):173–83.
12. Pastrana Y, M D, Acevedo M D. Efecto Antimicrobiano Del Clavo y La Canela Sobre Patógenos. *Bioteconología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. 2017;15(1):56–65.
13. Vara-Delgado A, Sosa-González R, Alayón-Recio CS, Ayala-Sotolongo N, Moreno-Capote G, Alayón-Recio V del C. Uso de la manzanilla en el tratamiento de las enfermedades periodontales. *Arch méd Camaguey*. 2019;23(3):403–14.
14. Bárbara I, Mota DO, Cunha LS, Luíza L, Braga A, Lima C, et al. Fitoterapia Na Odontologia : Levantamento Dos Principais. *Psicologia e Saude em*



- Debate. 2018;4(1):71–71.
15. Veloz JJ, Alvear M, Salazar LA. Evaluation of Alternative Methods to Assess the Biological Properties of Propolis on Metabolic Activity and Biofilm Formation in *Streptococcus mutans*. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. 2019;2019:1–8.
  16. López N, Susana Aymar J, Raquel M, Natalia M, Alejandra M, Eugenia M. Utilización Del Propóleos En Odontología. *Revista Ateneo Argentino en Odontología*. 2016;55(2):19–22.
  17. Peña RC. Estandarización en propóleos: antecedentes químicos y biológicos. Pontificia Universidad Católica de Chile, Facultad Agronomía e Ingeniería Forestal, Casilla 306-22, Santiago, Chile. 2008;35(1):17–26.
  18. Benítez N, Ortega N, Cabezas Fajardo FA. Actividad antibacteriana y composición cualitativa de propoleos provenientes de dos zonas climáticas del departamento del Cauca. *Bioteología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*. 2011;9(1):8–16.
  19. Wassel MO, Khattab MA. Antibacterial activity against *Streptococcus mutans* and inhibition of bacterial induced enamel demineralization of propolis, miswak, and chitosan nanoparticles based dental varnishes. *Journal of Advanced Research [Internet]*. 2017;8(4):387–92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jare.2017.05.006>
  20. Huaytalla Alemán RM, Gálvez Ramírez CM, Carhuapoma-Yance M, Alvarez-Paucar MA, López Guerra S. Efecto inhibitor in vitro del extracto etanólico de propóleo al 15% y 30% frente a cepas de *Lactobacillus acidophilus*. *Revista Estomatológica Herediana*. 2018;28(1):36–43.