



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO**

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**EFFECTO DEL EXTRACTO ETANÓLICO DEL PROPÓLEO CAFÉ SOBRE EL  
CRECIMIENTO Y LA FORMACIÓN DE BIOCAPAS POR LA BACTERIA  
*STREPTOCOCCUS MUTANS*.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA**

**MaryJose Gutiérrez Jasso**

**DIRECTOR DE TESIS**

**Dr. José Fausto Rivero Cruz**

**Ciudad Universitaria, Cd. MX., 2019.**





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Dra. María Isabel Aguilar Laurents  
**VOCAL:** Dra. Gloria Díaz Ruiz  
**SECRETARIO:** Dr. José Fausto Rivero Cruz  
**1er. SUPLENTE:** Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano  
**2° SUPLENTE:** Dr. Mario Alberto Figueroa Saldívar

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA ASESOR DEL TEMA:** Laboratorio 111, Departamento de Farmacia, Facultad de Química, UNAM.

**ASESOR DEL TEMA: DR. JOSÉ FAUSTO RIVERO CRUZ**

**SUSTENTANTE: MARYJOSE GUTIÉRREZ JASSO**

# Contenido

<b>INDICE DE FIGURAS .....</b>	<b>IV</b>
<b>INDICE DE CUADROS .....</b>	<b>IV</b>
<b>1. INTRODUCCION .....</b>	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES. ....</b>	<b>2</b>
2.1 HISTORIA.....	2
2.2 PRODUCCIÓN DE PROPÓLEO EN MÉXICO.....	3
2.3 TENDENCIA DE LA PRODUCCIÓN APÍCOLA EN MÉXICO Y A NIVEL MUNDIAL.....	3
2.4 PRODUCCIÓN, RECOLECCIÓN Y TRATAMIENTO DEL PROPÓLEO.....	5
2.5 CARACTERIZACIÓN DEL PROPÓLEO.....	6
2.5.1 Propiedades biológicas del propóleo.....	7
2.5.2 Capacidad antibacteriana.....	8
2.5.3 Capacidad antioxidante.....	9
2.6 MECANISMO DE ACCIÓN.....	10
2.6.1 Propiedades fisicoquímicas del propóleo.....	10
2.7 USO CLÍNICO DEL PROPÓLEO EN HUMANOS.....	11
2.8 NORMA OFICIAL MEXICANA DEL PROPÓLEO.....	11
2.9 CARIES DENTALES.....	12
2.9.1 Flora microbiana oral.....	13
2.9.2 Generalidades <i>S. mutans</i> .....	13
2.9.3 Patogénesis de <i>Streptococcus mutans</i> .....	15
2.9.4 Biocapa.....	15
2.9.5 Fases de formación de la biocapa.....	17
<b>3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....</b>	<b>19</b>
3.1 OBJETIVO GENERAL.....	21
3.2 OBJETIVOS PARTICULARES.....	21
<b>4. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....</b>	<b>22</b>
4.1 RECOLECCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL.....	22
4.2 PREPARACIÓN DEL EXTRACTO DE PROPÓLEO.....	22
4.3 MICROORGANISMO DE PRUEBA.....	23
4.4 EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA.....	23
4.4.1 Concentración mínima inhibitoria.....	23
4.4.2.... Evaluación del EEP sobre la formación de la biocapa producida por <i>S. mutans</i> .....	25
4.5 CUANTIFICACIÓN DE FENOLES TOTALES.....	26
4.6 CUANTIFICACIÓN DE FLAVONOIDES TOTALES.....	27
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>27</b>
5.1 CUANTIFICACIÓN DE FENOLES Y FLAVONOIDES.....	27
5.2 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI).....	29
5.3 EVALUACIÓN DEL EEP SOBRE LA FORMACIÓN DE LA BIOCAPA PRODUCIDA POR <i>S. MUTANS</i> .....	31
<b>6. CONCLUSIÓN.....</b>	<b>34</b>
<b>7. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>35</b>



## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Distribución geográfica de los propóleos en el mundo.....	4
<b>Figura 2.</b> Fases de formación de la biocapa. Representación de las cuatro etapas de desarrollo.....	19
<b>Figura 3.</b> Localización geográfica del estado de Zacatecas.....	23
<b>Figura 4.</b> Esquema de placa de 96 pozos utilizada en el ensayo de Concentración Mínima Inhibitoria.....	26
<b>Figura 5.</b> Efecto sobre la formación de la biocapa por <i>S. mutans</i> utilizando el ensayo de cristal violeta.....	33

## INDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Productos obtenidos de la colmena.....	6
<b>Cuadro 2.</b> Propiedades benéficas del propóleo.....	8
<b>Cuadro 3.</b> Determinaciones cualitativas y cuantitativas requeridas en la NOM-003-SAG/GAN-2017 para el propóleo.....	12
<b>Cuadro 4.</b> Especificaciones físicas indicadas para el propóleo.....	12
<b>Cuadro 5.</b> Contenido de fenoles y flavonoides totales en el extracto etanólico de propóleo de Zacatecas.....	30

## INDICE DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
$\text{AlCl}_3$	Cloruro de aluminio
ATP	Adenosín trifosfato
BHI	Infusión cerebro corazón
$^{\circ}\text{C}$	Grados Celsius
CAPE	Fenil éster del ácido cafeico
CHX	Digluconato de clorhexidina
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CMB	Concentración mínima bactericida
CLSI	Clinical & Laboratory Standards Institute
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidracilo
EAG	Equivalentes de ácido gálico
EEP	Extracto etanólico de propóleo
EQ	Equivalentes de quercetina
g	Gramos
GTF	Glucosiltransferasas
hr	hora
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
mg	Miligramos
mL	Mililitros
$\text{Na}_2\text{CO}_3$	Carbonato de sodio
nm	Nanómetros
NOM	Norma Oficial Mexicana
OMS	Organización Mundial de la Salud
pH	Potencial hidrógeno
RNA	Ácido ribonucleico
UFC/mL	Unidades formadoras de colonias / mL
UV	Ultravioleta
(v/v)	Volumen/volumen
$\mu\text{l}$	Microlitro
$\mu\text{g}$	Microgramo

## 1. INTRODUCCION

La miel, el propóleo y la jalea real, son productos que se originan en la colmena. El propóleo es una sustancia resinosa producida por abejas (*Apis mellifera*). Esta sustancia se ha utilizado en la medicina popular desde la antigüedad, debido al amplio espectro de actividad biológica que posee y se le han descrito propiedades antisépticas, antibacterianas, antimicóticas, astringentes, antiinflamatorias, anestésicas, anticancerígenas e inmunomoduladoras (Kuropatnicki *et al.*, 2013). Por este motivo, es utilizado ampliamente en la industria cosmética, alimentaria, medicina tradicional y como remedio casero (Valencia *et al.*, 2012).

El término propóleo deriva del griego pro (para 'delante de', 'a la entrada') y polis ('comunidad' o 'ciudad') y significa una sustancia en defensa de la vida. El propóleo es colectado por las abejas, a partir de exudados y brotes de arboles, por ejemplo: olmo, sauce álamo, abedul, pino entre otros. Una vez recolectado, este material se enriquece con secreciones salivales y enzimáticas y es utilizado por las abejas para mantener la temperatura interna de la colmena con el fin de propiciar un ambiente estable y estéril, también es utilizado para cubrir las paredes de la colmena, las grietas de relleno o brechas y evitar la colonización por otros insectos (Tolba *et al.*, 2016).

El propóleo es un material ceroso, pegajoso y maleable al tacto a una temperatura entre 60° a 70 °C. En temperaturas bajas -1° a -20 °C se presenta quebradizo y frágil y su punto de fusión es de 100 °C (Kuropatnicki *et al.*, 2013).

El propóleo está compuesto principalmente de resinas, bálsamos y ceras, y en menor proporción por aceites esenciales, aceites aromáticos, polen y desechos orgánicos. La composición química y sus constituyentes varían cuantitativa y cualitativamente dependiendo de la zona geográfica de donde fue recolectado, así como de la fuente natural donde las abejas realizaron la colecta del producto vegetal y la temporada en la que fue recolectado (Ueda *et al.*, 2017).

A la fecha, se han identificado más de 300 constituyentes en el propóleo, entre los que podemos destacar polifenoles, quinonas, cumarinas, aminoácidos, esteroides y compuestos orgánicos (Farooqui *et al.*, 2012).



## **2. Antecedentes.**

### **2.1 Historia.**

El propóleo es un remedio natural que se ha empleado ampliamente desde la antigüedad. Los egipcios conocían muy bien las propiedades anti-putrefacción del propóleo y lo usaban para embalsamar cadáveres. El propóleo fue reconocido por sus propiedades medicinales por los médicos griegos y romanos, Aristóteles, Dioscórides, Plinio y Galeno. Esta sustancia fue empleada como un antiséptico y cicatrizante en el tratamiento de heridas, así como desinfectante de boca.

El propóleo también fue reconocido por otros pueblos no relacionados con las civilizaciones del Viejo Mundo: los Incas empleaban el propóleo como agente antipirético, y las farmacopeas de Londres del siglo XVII enumeraban el propóleo como una droga oficial. Entre los siglos XVII y XX la droga se hizo muy popular en Europa debido a su actividad antibacteriana. Los herbolarios modernos la recomiendan por sus propiedades antibacterianas, antifúngicas, antivirales, hepatoprotectoras y antiinflamatorias, para aumentar la resistencia natural a las infecciones y para tratar las úlceras gastroduodenales. Aplicado externamente, el propóleo alivia varios tipos de dermatitis causadas por bacterias y hongos (Kuropatnicki *et al.*, 2013).

Actualmente, el propóleo se usa como un remedio popular y está disponible en forma de cápsulas (en forma pura o combinadas con gel de aloe y rosa canina), como extracto (hidroalcohólico o glicólico), como enjuague bucal (combinado con melisa, salvia, malva y romero), en pastillas para la garganta, cremas y en forma de polvo (para usar en gárgaras o para uso interno una vez disuelto en agua). También está disponible comercialmente como producto purificado en el que se ha eliminado la cera. También se afirma que es útil en cosméticos y como componente de alimentos saludables (Valencia *et al.*, 2012).

## **2.2 Producción de propóleo en México.**

La apicultura en México, en especial en las regiones tropicales, es una actividad que se practica desde hace varias centurias y en la actualidad ha adquirido gran relevancia socioeconómica, ya que representa una fuente importante de empleos e ingresos en el medio rural y de divisas para el país (SAGARPA, 2010).

Los diez principales estados productores de miel en México son: Yucatán, Campeche, Jalisco, Veracruz, Guerrero, Chiapas, Puebla, Quintana Roo, Oaxaca y Michoacán.

Sin embargo, la producción de propóleo en México es muy limitado, debido a que muchos apicultores mexicanos carecen del conocimiento para la extracción y procesamiento del propóleo, así como el valor de las resinas; por lo que la mayor producción está basada en el raspado interno que se realiza durante la revisión de las colmenas (SAGARPA, 2010).

## **2.3 Tendencia de la producción apícola en México y a nivel mundial.**

Aproximadamente 44 mil productores practican esta actividad pecuaria en todo el país y en 2012 poseían un poco más de un millón 898 mil colmenas. La producción de miel durante el período 1990 a 2012 presentó una tendencia general hacia la baja con marcados altibajos y el volumen promedio anual fue de 57.3 mil toneladas. En cuanto a las regiones apícolas de México, se tiene constatado que la más importante es la del Sureste. En esta región se ubican los estados con relevancia nacional como Yucatán, Campeche, Quintana Roo, parte de Tabasco y Chiapas; mientras que en la región Pacífico se localizan el estado de Jalisco, Michoacán, Sinaloa y Nayarit., en la región Golfo, se ubican Veracruz, parte de San Luis Potosí, Hidalgo, Tamaulipas y Querétaro (SAGARPA, 2010).

La miel es el principal producto por peso y valor que se obtiene de las colmenas, su destino es tanto la venta como el autoconsumo de la familia y se obtiene de procesos que se diferencian por los insumos utilizados y por las formas de manejo de la colonia. El segundo producto apícola de importancia es la cera y es obtenida por 68.4% de los apicultores. Los otros productos con menor importancia relativa por cantidad son el polen, propóleo y la jalea real (SAGARPA, 2010).

Dado que la zona geográfica es uno de los factores primordiales a considerar en la composición y por ende en la actividad biológica de los propóleos, estos se han estudiado extensivamente en diversas partes del mundo. Basándose en el origen floral y su perfil fitoquímico, los propóleos se han clasificado en cinco grupos. En la Figura 1 se observa la distribución de los propóleos a nivel mundial.



**Figura 1.** Distribución geográfica de los propóleos en el mundo (Salatino *et al.*; 2011).

Por ejemplo, en muestras provenientes de países del trópico, se han identificado moléculas de terpenoides, derivados prenilados de ácidos hidroxicinámicos, liganos y benzofenonas preniladas (Martínez *et al.*, 2012). En Brasil se han aislado como constituyentes principales del propóleo terpenoides y derivados prenilados de ácidos *p*-cumáricos (Marcucci, 1995), mientras que en Chile se han detectado, predominantemente, liganos, y en Venezuela, Brasil y Cuba se hallaron benzofenonas preniladas (Palomino *et al.*, 2010).

Los propóleos originarios de zonas templadas (oeste de Asia, Europa y América del Norte) poseen una composición química parecida entre ellos en la que sobresalen los compuestos fenólicos (flavonoides, ácidos cinámicos y derivados).

## **2.4 Producción, recolección y tratamiento del propóleo.**

Las abejas de la especie *Apis mellifera* recolectan resina de las yemas y grietas que se encuentran en las cortezas de los árboles y brotes de las hojas. Posteriormente se añaden a la resina secreciones enzimáticas y el material parcialmente digerido es mezclado con la cera de abeja (Burdock, 1998). Esta producción, depende de factores climáticos, recursos forestales, genética de las abejas y del mecanismo de recolección. La producción de propóleo al año puede variar entre 150 a 200 gramos (Ghisalberti, 1979). La recolección del propóleo de las colmenas se realiza mediante los métodos de raspado o trampas, siendo este último el que ofrece una mejor calidad; ya que permite disminuir la contaminación de la resina provocada por la manipulación a diferencia de la primera técnica. La temporada de recolección se realiza dependiendo de las condiciones ambientales estacionales, donde se ha observado una propolización más activa; en las zonas templadas la obtención se realiza antes de la llegada del invierno, mientras que en climas tropicales se realiza en épocas lluviosas (Farré *et al.*, 2004).

En cuanto al tratamiento del propóleo, si éste es muy ceroso se lava con agua fría y es secado con aire en pantallas de acero inoxidable. Posteriormente se disuelve en etanol al 95% para remover ceras y se filtra para retirar residuos de material orgánico no deseado (SAGARPA, 2010).

Para que las propiedades del propóleo obtenido no se pierdan o alteren, es recomendable acopiarlo en bolsas de plástico transparentes, hasta que se entregue para su utilización. Se debe tener la precaución de no almacenar grandes volúmenes, para evitar que se compacte desmereciendo significativamente la calidad del producto. Es prudente guardar estas bolsas dentro de cajas de cartón, madera o un recipiente apropiado que lo proteja de las altas temperaturas y en especial de la luz. Otra posibilidad es conservarlo en frascos de vidrio de color ámbar.

En general, si el propóleo se va a almacenar por largo tiempo se debe conservar sometiéndolo a temperaturas que oscilen entre -10° a -20 °C durante 48 hr. Se pueden utilizar refrigeradores de uso doméstico. Una vez retirado del mismo no debe dejarse en contacto con el aire ya que puede absorber humedad (SAGARPA, 2010).

## 2.5 Caracterización del propóleo.

La agricultura es la principal beneficiaria de los servicios polinizantes realizados por las abejas. Entre los cultivos que dependen de la polinización por insectos o que aumentan su producción cuando abundan las abejas en época de floración, están los frutícolas y los de semillero ya que el polen de estas plantas es demasiado pesado y pegajoso para ser dispersado por el viento, en contraste con el de los cereales y las herbáceas, que son polinizados por este medio.

Dentro de los insectos de fácil manejo que pueden ser llevados al cultivo para el expreso propósito de la polinización, se destaca la abeja melífera (*Apis mellifera*) por su organización social y por contar con un mayor número de individuos por unidad de espacio. La utilización de la abeja como agente polinizador y su contribución al mejoramiento de las cosechas en los diferentes sistemas de producción agrícola ha representado grandes beneficios económicos, de tal manera que los en algunos países, los productos directos de la apicultura han pasado a segundo plano (Díaz, 2011).

Las abejas elaboran diferentes productos y servicios que son útiles para su subsistencia y que además son usados por el hombre. En el Cuadro 1 se resumen los principales productos obtenidos de la colmena.

**Cuadro 1.** Productos obtenidos de la colmena (Mendizábal, 2005).

<b>Productos y servicios</b>	<b>Utilización para las abejas</b>	<b>Utilización para el hombre</b>
Abejas	Mantener la población necesaria	Comercializar reinas, paquetes de abejas, núcleos y colmenas
Apitoxina	Veneno para defenderse	Uso medicinal
Cera	Construir panales	Construir panales artificiales, velas, compuestos en productos químicos para conservación
Jalea Real	Alimento de las larvas y de la abeja reina	Alimento tonificante

Miel	Alimento	Alimento (puro o como ingrediente)
Polen	Alimento de crías y abejas	Alimento y uso medicinal
Polinización	Mejora la propagación de la especie vegetal	Incrementar la productividad agrícola
Propóleo	Cubrir rajaduras de la colmena. Cubrir superficies para evitar la contaminación	Barnices, uso medicinal, bactericida, ingrediente de golosinas dietéticas, cremas y jabones

### 2.5.1 Propiedades biológicas del propóleo.

Las propiedades antimicrobianas, antifúngicas, antivirales y antiparasitarias que se le atribuyen a este producto, también denominadas como actividad biológica o simplemente bioactividad (Banskota *et al.*, 2001) varían en función de la fuente natural geográfica (Yaghoubi *et al.*, 2007) y se atribuyen a la presencia de componentes químicos identificados como familias de polifenoles, flavonoides, ácidos fenólicos, etcétera, que pueden llegar a superar los 150 compuestos en un propóleo (Palomino *et al.*, 2010). Entre las moléculas farmacológicamente activas destacan las de tipo flavonoides y ácidos fenólicos con sus ésteres.

Lamentablemente, pocos estudios han sido desarrollados con propóleos mexicanos (Lotti *et al.*, 2010), pero es evidente que todo lo anterior sugiere que su actividad biológica se debe a la combinación y sinergias de los diferentes compuestos que contiene.

Si bien, la composición del propóleo es muy compleja y variada, se puede hacer una estimación de sus componentes más importantes: resinas 50 %; ceras 30 %; polen 5 %; aceites esenciales 10 % y 5 %, de otros residuos orgánicos. Debe señalarse que la mayoría de los estudios no pretenden determinar la composición química completa, sino tan solo algunos de los elementos de interés, así como la cuantificación de estos (Bracho, 2003). Las propiedades benéficas reportadas del propóleo se enlistan en el Cuadro 2.

**Cuadro 2.** Propiedades benéficas del propóleo (Alves *et al.*, 2007).

<b>Propiedades benéficas del propóleo.</b>	
Bactericida	Sustancias producidas por microorganismos que suprimen selectivamente el crecimiento o destruyen a otros microorganismos en concentraciones muy bajas.
Fungicida	Son fármacos que se indican para las micosis superficiales y sistémicas.
Antiviral	Inhiben o inactivan al virus causando los mínimos efectos sobre el huésped.
Antitumoral	Afectan a las células que se reproducen a mayor velocidad con independencia de si sean tumorales o no.
Cicatrizante	Regeneran los tejidos cuando presentan una herida.
Antiinflamatorio	Inhiben la liberación de prostaglandinas.
Analgésico	Es el bloque de los impulsos nerviosos que afectan siempre a la conducción de los estímulos dolorosos mientras que las sensaciones de tacto o presión no quedan abolidas totalmente.
Antialérgico	Inhiben la respuesta del organismo ante los antígenos.
Anestésico	Son sustancias que bloquean la conducción nerviosa de manera específica, temporal, reversible, sin afectar la conciencia del paciente, ya que solo se aplica en determinada región.
Inmunoestimulante	Estimula el sistema inmunitario.

### **2.5.2 Capacidad antibacteriana.**

Una de las propiedades más importantes del propóleo es su actividad antimicrobiana, la cual se atribuye fundamentalmente a los flavonoides (Asis, 1989). Los extractos de propóleo han sido evaluados sobre bacterias Gram positivas y negativas, encontrándose una mayor efectividad sobre las primeras (Akopyan *et al.*, 1970).

El grupo más importante de compuestos encontrado en propóleos son los denominados fenoles, los cuales, constituyen más del 50% del peso total. Las propiedades médicas del propóleo son atribuidas principalmente a la presencia de

estas sustancias. Más aún, la literatura apunta que algunas de las actividades pueden estar fuertemente relacionadas a los flavonoides, el principal compuesto fenólico del propóleo (Brushi *et al.*, 2003).

Los flavonoides son pigmentos vegetales, sintetizados a partir del aminoácido fenilalanina, que generalmente exhiben brillantes colores como el de los pétalos de las flores. La mayoría de las veces emiten fluorescencia cuando son excitados por la luz UV, y se localizan en las células de las plantas verdes. Los flavonoides son usados por los botánicos para clasificación taxonómica. Ellos regulan el crecimiento de las plantas e influyen en otras células biológicas de diversas maneras. Los flavonoides inhiben o destruyen muchas especies bacterianas, inhiben importantes enzimas virales, tales como la transcriptasa reversa y otras diversas. Poseen actividad antialérgica, antiinflamatoria, antioxidante, atrapadora de radicales libres, antimutagénica y moduladora de actividad enzimática. Además, se puede decir que aportan grandes beneficios para la salud al actuar como agentes quimiopreventivos en cáncer y prevención de ataques al corazón. Su toxicidad a células animales es baja. Muchos profesionales están incrementando el uso de flavonoides puros para tratar muchas importantes enfermedades, debido a su comprobada habilidad de inhibir enzimas específicas, simular algunas hormonas y neurotransmisores, y eliminar radicales libres (Koning 1985).

### **2.5.3 Capacidad antioxidante.**

Los compuestos fenólicos y flavonoides son los elementos más abundantes en el propóleo, esto ha favorecido el estudio de su capacidad antioxidante y de eliminación de radicales (Viuda-Martos *et al.*, 2008).

El ensayo de atrapamiento del radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidracilo) es uno de los métodos *in vitro* más utilizados para la evaluación de la capacidad antioxidante del propóleo. El DPPH es un radical libre estable que reacciona con compuestos capaces de donar un átomo de hidrógeno. Este método se basa en el atrapamiento del DPPH a través de la adición de especies antioxidantes que



decoloran dicha solución. Al finalizar, la actividad antioxidante es determinada por una disminución en la absorbancia a 515 nanómetros (Moreno *et al.*, 2000).

## **2.6 MECANISMO DE ACCIÓN.**

El mecanismo de acción antimicrobiano del propóleo es complejo (Amoros *et al.*, 1992). De acuerdo con estudios recientes, la actividad en contra de los microorganismos está más relacionada al efecto sinérgico de los flavonoides (y otros fenoles), que a la acción de cada uno de ellos por separado. Estos descubrimientos están de acuerdo con lo que estudiaron varios autores, quienes observaron que la acción antibacteriana utilizaba varios mecanismos, tales como la desorganización del citoplasma, de la membrana plasmática, y de la pared celular, bacteriolisis parcial, e inhibición de la síntesis de proteínas. Además, se observó una inhibición de la división celular en presencia de propóleo, y este hecho sugirió que el propóleo podría actuar inhibiendo la replicación del DNA a través de la RNA polimerasa e, indirectamente, afectando la división celular (Takaisikikuni *et al.*, 2004).

### **2.6.1 Propiedades fisicoquímicas del propóleo.**

El propóleo es un material fuertemente adhesivo. Al analizar las propiedades físicas de diversas muestras de propóleos se determinó lo siguiente (Chaillou, 2004).

- a) Características organolépticas: 100 % presentó estructura homogénea, el 45% presentó un aspecto de trozos irregulares con brillo, el 30 % con poco brillo, y el resto trozos irregulares opacos. Los ensayos de consistencia mostraron que el 45 % de las muestras eran poco blandas, el 40 % duras y solamente un 15 % blandas. Con respecto al color, el 65 % de las muestras presentaron color marrón oscuro, un 20 % marrón claro con tintes amarillos, un 10 % con tintes castaños. El olor del 75 % de las mismas fue resinoso, y el sabor de la totalidad de los propóleos fue picante.
- b) Punto de fusión: los valores encontrados para las diferentes regiones en estudio fluctuaron entre los 64 °C y 89.5 °C con un promedio de 70 °C.

- c) Impurezas mecánicas, ceras y resinas: el valor medio de impurezas mecánicas analizadas fue de 24.063 %, contenido de cera promedio, de 30.048 % y el porcentaje de resinas, 44.770%.
- d) Índice de oxidación: el rango de valores del índice de oxidación osciló entre los 4 y 18 segundos, el promedio fue de 9.8 segundos.

## **2.7 Uso clínico del propóleo en humanos.**

Es de suma importancia que para su utilización en seres humanos, éste debe de realizarse con parámetros de vigilancia, principalmente en aquellos pacientes que presenten reacciones inmunoalérgicas a los productos de las abejas.

Entre las aplicaciones médicas que se han realizado con el propóleo, se han reportado en el tratamiento de infecciones en vías respiratorias altas, resfriado común, gripe, sinusitis, otitis, laringitis, bronquitis, asma bronquial, neumonía crónica y manejo de tuberculosis pulmonar. Además, se ha utilizado como anti reumático, inhibidor de melanomas y carcinoma de células tumorales, regeneración tisular, actividad antidiabética, foto inhibidor, etc.

De igual manera en dermatología para el tratamiento de abscesos, forúnculos, grietas, verrugas, infección en la raíz de las uñas y otras afecciones de piel. Es también eficaz en otros problemas como conjuntivitis, infecciones y aftas bucales, etcétera (Vidia *et al.*, 2011).

## **2.8 Norma oficial mexicana del propóleo.**

Con el objetivo de establecer los estándares de calidad pertinentes para esta resina apícola, en el 2017 se introdujo la Norma Oficial Mexicana: NOM-003-SAG/GAN-2017. La regulación comprende aspectos fundamentales que incluyen la instrucción sobre el proceso e instrumentos de recolección, especificaciones físicas, químicas y microbiológicas que debiera cumplir cada cosecha, así como los métodos de prueba relacionados con el acondicionamiento de las muestras, la preparación de reactivos y otros estudios de laboratorio. En los Cuadros 3 y 4 se

resumen las determinaciones cualitativas, cuantitativas y especificaciones físicas requeridas para los propóleos en la Norma Oficial Mexicana.

**Cuadro 3.** Determinaciones cualitativas y cuantitativas requeridas en la NOM-003-SAG/GAN-2017 para el propóleo.

Parámetros	Características
Fenoles totales	Presencia
Flavonoides	Presencia
Índice de oxidación	Máximo 22 segundos
Compuestos fenólicos	Expresados como equivalentes de ácido gálico: Mínimo 5% (peso/peso)
Flavonoides	Expresados como equivalentes de quercetina: Mínimo 0.5% (peso/peso)
Actividad antioxidante	Mínimo 100 microgramos/mililitro

**Cuadro 4.** Especificaciones físicas indicadas para el propóleo en la NOM-003-SAG/GAN-2017 para el propóleo.

Parámetros	Características
Color	Rojo, amarillo-rojizo, amarillo-oscuro, verde castaño, pardo o negro, variando conforme a su origen botánico.
Aroma	Resinoso (olor a madera) o balsámico (olor a cera), dependiendo de su origen botánico.
Sabor	Variable de suave balsámico, a fuerte y picante, dependiendo de su origen botánico.
Consistencia	A temperatura ambiente maleable o rígido, dependiendo de su origen botánico.

## 2.9 Caries dentales.

De las enfermedades infecciosas que afectan a los seres humanos, la caries dental es probablemente la más prevalente (Escribano *et al.*, 2005).

Se describe la caries dental como una enfermedad infecciosa y transmisible de origen multifactorial, en la cual ocurre un proceso dinámico, de desmineralización y remineralización, producto del metabolismo bacteriano sobre la superficie dentaria, que con el tiempo puede producir una pérdida total de minerales y que

puede resultar en la presencia de una cavidad. Las bacterias orales pertenecen a una comunidad compleja de numerosas especies que participan en la formación de la placa bacteriana (biopelícula) con todas sus funciones, interacciones y propiedades. Actualmente se sabe, que varios microorganismos son responsables de la patogénesis de las caries dentales (*S. mutans*, *Lactobacillus* spp. y *Actinomyces* spp.) de los cuales, *Streptococcus mutans* es el agente más importante asociado a ella. Las caries y la periodontitis son causadas por un desequilibrio en las poblaciones bacterianas de biopelículas que se forman naturalmente y evitan mantener un estado saludable de la cavidad oral.

### **2.9.1 Microbiota oral.**

La microbiota oral es un ecosistema complejo y abierto que contiene una amplia variedad de especies microbianas, como bacterias, hongos y levaduras; algunos son considerados flora habitual entre los que predominan los anaerobios estrictos pertenecientes a los géneros *Prevotella*, *Peptostreptococcus* o anaerobias facultativas como *Streptococcus*, *Staphylococcus* y *Corynebacterium*. Estos microorganismos son predominantes de acuerdo con los distintos sitios de localización (Takahashi *et al.*, 2005).

La placa dental se desarrolla en las superficies dentales expuestas las cuales están cubiertas por una película amorfa, casi invisible compuesta principalmente por glicoproteínas salivales. Sin embargo, algunos otros microorganismos pueden adherirse a superficies epiteliales o adamantinas de manera mecánica en fosas, fisuras de los dientes ó bien en el surco gingival (Takahashi *et al.*, 2005).

De no tomarse medidas de higiene oral, las superficies de los dientes acumulan grandes masas microbianas, o bien ocurre la acumulación en las superficies de la mucosa oral. El número de bacterias en placa dental puede alcanzar  $10^8$  UFC/mL (Fátima, 2008).

### **2.9.2 Generalidades *Streptococcus mutans*.**

*Streptococcus mutans* es una bacteria Gram positiva, dispuesto en cadena, no móvil, que ha sido reconocido por muchos años como el principal microorganismo implicado en el desarrollo de la caries dental, afecta a un gran número de

personas. El 95% de la población mayor de 20 años posee historia de caries, lo que convierte a esta patología en un problema de salud pública (Tanzer *et al.*, 2001). *S. mutans* es capaz de metabolizar un rango de carbohidratos mayor que cualquier otro microorganismo Gram positivo, es productor rápido de ácido láctico con capacidad de cambiar un medio de pH= 7.0 a pH 4.2 en aproximadamente, 24 horas. Es fermentador de glucosa, lactosa, rafinosa, manitol, inulina y salicina con producción de ácido. Esta bacteria cariogénica es anaerobia facultativa, es decir, puede o no utilizar el oxígeno para sobrevivir; aunque su crecimiento óptimo es en condiciones de anaerobiosis, vive en el tracto respiratorio, bucal y gastrointestinal de los seres humanos (Koneman, 2008).

La pared celular de *S. mutans* está formada por polisacáridos, ácidos teicoicos, glucosiltransferasas y proteínas de unión a carbohidratos, y están asociadas a estructuras de las bacterias como fimbrias, cápsula y pilis (Rocha *et al.*, 2004).

*Streptococcus mutans* además se considera como un microorganismo que causa bacteremia y endocarditis infecciosa. Previamente, se ha clasificado en tres serotipos c, e y f debido a la diversa composición química de los polisacáridos localizados en la pared celular, los cuales están compuestos por un esqueleto de ramnosa y cadenas laterales de glucosa. Estos polisacáridos de la pared celular juegan un papel importante en la colonización de sus nichos ecológicos. Las diferencias en las afinidades para la unión de los antígenos de polisacáridos a los tejidos humanos pueden ser la causa de esta distribución tan variada (Inaba *et al.*, 2010).

Además de la morfología característica de las colonias y su habilidad para fermentar ciertos azúcares (especialmente manitol y sorbitol) también pueden diferenciarse por adherirse a superficies lisas en presencia de sacarosa. La capacidad patogénica de *S. mutans* se fundamenta en sus propiedades adhesivas, así como en su capacidad acidofílica, acidogénica y acidúrica, entre otros procesos que aumentan su virulencia durante el proceso cariogénico. El *S. mutans*, además se adhiere a superficies bióticas y abióticas para multiplicarse y sumergirse en una matriz viscosa, formando colonias microbianas conocidas como biopelículas (Gamboa *et al.*, 2004).

### **2.9.3 Patogénesis de *Streptococcus mutans*.**

La virulencia de *S. mutans* está relacionada con el metabolismo de la sacarosa. Las enzimas glucosiltransferasas (GTF) producidas por *Streptococcus mutans* se han reconocido como factores de virulencia en la patogénesis de la caries dental (Yamashita *et al.*, 1993). Las enzimas GTF catalizan la formación de glucanos  $\alpha$ -ligados solubles e insolubles a partir de sacarosa y contribuyen significativamente a la composición de polisacáridos de la matriz de placa dental (Rolla *et al.*, 1983). La placa dental es esencialmente una biopelícula. Los glucanos promueven la adherencia y la acumulación de estreptococos cariogénicos en la superficie dental y juegan un papel esencial en el desarrollo de la placa dental patógena relacionada con la actividad de formación de caries (Yamashita *et al.*, 1993).

*S. mutans* produce al menos tres GTF: GTF B, que sintetiza un polímero de glucano principalmente  $\alpha$ 1, 3 insoluble; GTF C, que sintetiza una mezcla de glucano insoluble  $\alpha$ 1,3-ligado y glucano soluble  $\alpha$ 1,6-ligado; y GTF D, que sintetiza glucano soluble unido a  $\alpha$ 1,6 (Aoki *et al.*, 1986). Una gran proporción de los glucanos sintetizados por estos GTF adsorbidos en la superficie se retienen en la película y puede proporcionar sitios de unión para *S. mutans*, lo que contribuye a la formación *in situ* de la placa dental (Schilling *et al.*, 1992). Por lo tanto, la inhibición de los GTF en solución y adsorbidos en la película de la superficie del diente es una de las estrategias para prevenir la caries dental y otras enfermedades relacionadas con la placa.

El propóleo inhibe la unión de este microorganismo a la superficie del esmalte, actuando sobre la enzima glucosiltransferasa que ha sido reconocida como un factor de virulencia en la patogenicidad de la caries dental (Koo *et al.*, 2002).

### **2.9.4 Biocapa.**

En la naturaleza, las bacterias existen en consorcios, adheridas a interfaces o unas con otras (Flemming *et al.*, 2010) formando comunidades sésiles capaces de responder y adaptarse a cambios en el ambiente o llevar a cabo tareas altamente especializadas similares a las de organismos multicelulares (Karunakaran *et al.*, 2011).

La biocapa, es un conglomerado dinámico y complejo de bacterias, materia orgánica y sustancias inorgánicas, descritos como células irreversiblemente unidas, embebidas en una matriz de exopolisacárido autoproducido y adheridas a una superficie o a un tejido vivo (Castrillón, 2010).

Su composición varía de una a otra persona, entre distintas localizaciones en la cavidad oral e incluso entre posiciones diferentes dentro de la misma pieza dental (Pérez, 2005). La formación de la biocapa puede llevarse a cabo en presencia ó en ausencia de alimento. En ausencia de ingesta de alimentos, las bacterias utilizan fuentes endógenas de nutrientes. Las fuentes de estas sustancias incluyen la saliva, el fluido gingival, las células epiteliales descamadas, los componentes de la sangre. Así como, productos metabólicos terminales o factores de crecimiento liberados por microorganismos vecinos.

A diferencia, de la formación de esta biopelícula en presencia de alimento, se utilizan fuentes exógenas de alimento. Las cuales dependen de la composición, forma y consistencia de la dieta, así como la frecuencia de la ingesta. La influencia del contenido de azúcar es uno de los factores que más se ha estudiado. Hay un alto número de microorganismos que utilizan carbohidratos como principal fuente de energía. De forma tal, que producen ácidos orgánicos como producto final de su metabolismo (Negroni, 2009).

La biocapa puede estar compuesta hasta por 30 distintas especies bacterianas, su contenido en agua sólo representa el 10% de la biocapa. La matriz (material extracelular) constituye cerca del 90%. Estudios recientes han señalado que existen dos compartimientos principales en la biocapa: una fase acuosa y otra fase sólida o celular. La fase acuosa representa el 10 al 25 % del peso total del mismo (Flemming *et al.*, 2010).

Las proteínas constituyen el componente principal de la fase sólida (entre el 30-50 % del peso seco), siendo aportadas por la secreción salival y el fluido cervicular. También se encuentran lípidos (entre el 10 y el 15 % del peso seco) y carbohidratos (10 % a 20 % del volumen se encuentra en forma de polisacáridos). La película además contiene albúmina, lisozima y componentes del fluido gingival

y una de sus principales características es brindar la fuerza para que los microorganismos se unan a los sustratos. También ayuda a mantener el pH, temperatura, fuerza iónica y nutrientes (Rocha *et al.*, 2004). Debido a la gran diversidad nutricional de los microorganismos, la localización de cada uno de ellos está influida por la disponibilidad de los nutrientes requeridos.

### **2.9.5 Fases de formación de la biocapa.**

La formación de la biocapa ocurre en tres etapas, que a continuación se describen:

#### **A. Colonización y Adhesión reversible de microorganismos.**

La formación de la biocapa ocurre cuando una bacteria se deposita sobre la superficie dental, esto depende de factores ambientales (pH, temperatura) así como de factores genéticos que codifican para funciones motrices (fimbrias, flagelos ó pilis) (Kraigsley *et al*; 2002).

La película modifica su carga debido a las fuerzas fisicoquímicas que se dan entre bacterias y la superficie del diente recubierto (fuerzas de Van der Waals).

#### **B. Adhesión irreversible.**

Después de la unión inicial, las bacterias comienzan a dividirse y las células hijas comienzan a esparcirse sobre la superficie en mono capa, formando micro colonias.

En una etapa posterior la bacteria comienza a secretar un exopolisacárido que constituye la matriz de la biocapa en donde se forma una estructura tridimensional con canales acuosos. Este sistema permite establecer un vínculo con el medio externo permitiendo la entrada de nutrientes y la salida de metabolitos tóxicos para las bacterias (Rocha-Gracia, 2006).

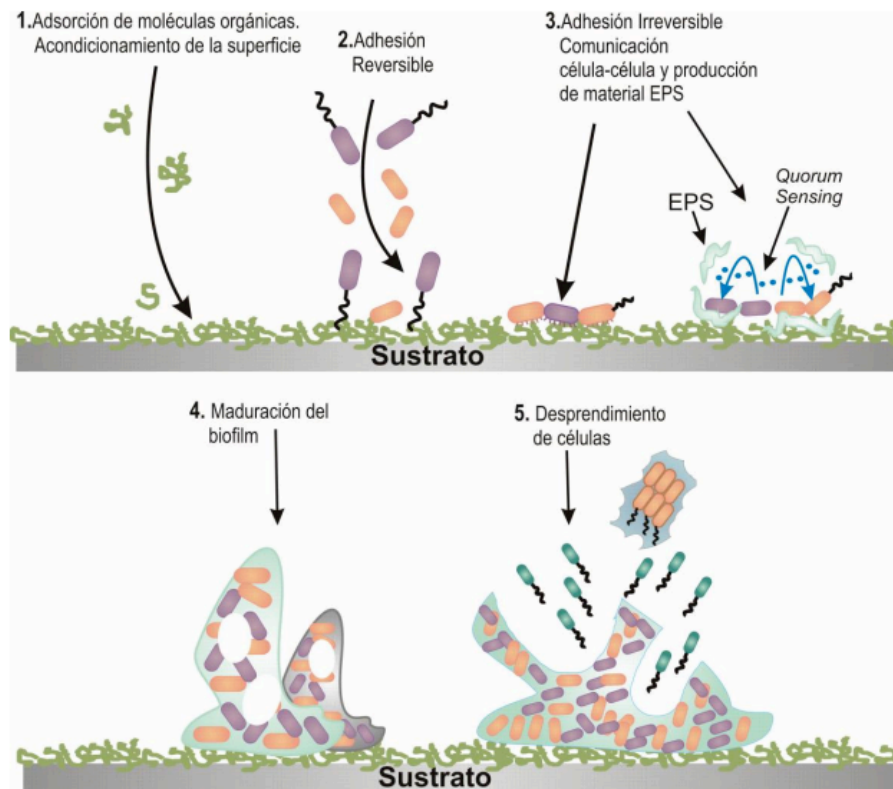


### C. Maduración de la biocapa.

Esta etapa del desarrollo de la biocapa corresponde a la maduración que da como resultado una arquitectura compleja, con canales, poros y redistribución de bacterias en el sustrato. La densidad de la biocapa aumenta a medida que los organismos adheridos se replican, mueren y los componentes extracelulares de las bacterias interactúan con las moléculas orgánicas e inorgánicas presentes en el medio ambiente circundante (Díaz, 2011).

### D. Desprendimiento.

El proceso de formación y desarrollo de la biocapa termina una vez que la biopelícula ha madurado y se libera la matriz con el fin de colonizar nuevas superficies. Este desprendimiento, se considera un proceso continuo (Stewart, 1996).



**Figura 2.** Fases de formación de la biocapa. Representación de las cuatro etapas de desarrollo (Díaz, 2011)

### **3. Justificación y objetivos.**

Nueve de cada 10 personas en el mundo está en riesgo de tener algún tipo de enfermedad bucodental, lo cual incluye desde caries hasta enfermedades de las encías pasando por el cáncer de boca. La prevención de estas comienza en la infancia y, sin embargo, incluso en los países desarrollados, entre el 60% y el 90% de los niños en edad escolar tienen caries. Desde 1978 la OMS ha estado promoviendo y desarrollando las medicinas alternativas y terapias naturales con eficiencia científicamente demostrada en los servicios nacionales de salud en cada país (OMS, 2005).

Los programas de salud existentes se enfocan la mayor parte del tiempo a corregir y no a prevenir el problema. Otro gran problema es el uso excesivo de antibióticos, así como su mal manejo, lo cual ha propiciado la aparición de bacterias resistentes, propiciando que los tratamientos sean menos efectivos, más invasivos y costosos.

Desde sus orígenes, la humanidad ha buscado en las plantas una alternativa para tratar los padecimientos que la aquejan, plantas cuyas propiedades terapéuticas han sentado las bases de la medicina empírica, la que se ha mantenido durante siglos sin que los conocimientos científicos modernos hayan podido prescindir de ellas (Mitscher, 2000).

La apiterapia es un tratamiento terapéutico que utiliza productos derivados o extraídos de la colmena, entre los que se encuentran: miel de abejas, polen, propóleos, jalea real, veneno de abejas, cera, así como la combinación de los productos anteriores. Entre los remedios naturales que más se mencionan se encuentra el propóleo (Salatino *et al.*, 2011). En este sentido, dicho producto natural representa una opción que puede ayudar a combatir eficazmente a los microorganismos patógenos de manera accesible a la población, debido a su composición química compleja (Castillo-García, 2007). Es importante mencionar, que estudios recientes demuestran que el valor de dichos productos naturales en la prevención y tratamiento de las enfermedades de la cavidad oral sin ocasionar

efectos adversos e indeseables. Por ello, la implementación de nuevos métodos para disminuir la prevalencia e incidencia de esta enfermedad son necesarias.

La caries dental, por ejemplo, es una enfermedad oral relacionada con la formación de biocapas que continúa afectando a la mayoría de la población mundial (Marsh, 2003). Donde *Streptococcus mutans* juega un rol clave en la patogénesis de la enfermedad.

Esta bacteria es capaz de (i) producir y tolerar ambientes ácidos; (ii) sintetizar glucanos insolubles en agua a partir de sacarosa mediante la acción de glucosiltransferasas (GTFs); y (iii) adherirse fuertemente a la película adquirida en las superficies dentales (Quivey, 2000., Bowen, 2011). La combinación de estos factores de virulencia permite a *S. mutans* colonizar las superficies dentales de manera efectiva y modular la transición de biocapas no patogénicas a biocapas cariogénicas, lo cual deriva en la formación de caries (Jeon, 2011). Por lo tanto, las estrategias dirigidas a inhibir la viabilidad y virulencia de *S. mutans* deben ser precisas y selectivas para la prevención de la caries dental. Además, los estudios en los que se utilizan plantas para prevenir o tratar enfermedades orales tales como la caries dental han recibido bastante atención debido al uso de agentes quimioterapéuticos comerciales anti-caries como la clorhexidina; cuyo uso no sólo es controversial, sino que tiene varios efectos secundarios tales como manchas en los dientes y la aparición de resistencia bacteriana (Ban *et al.*, 2012).

Por otro lado, también existen informes, en los que se reporta que el propóleo muestra un espectro muy amplio de actividad biológica y entre ellas se reportan propiedades antioxidantes, antiinflamatoria y sobre todo antimicrobiana atribuida principalmente, a la presencia de flavonoides como la pinocembrina, galanina y al fenil éster del ácido caféico (CAPE), estos flavonoides son conocidos por conferir resistencia frente al ataque de microorganismos (Nam *et al.*, 2016).

### **3.1 Objetivo general.**

Evaluar el efecto del extracto etanólico del propóleo café de Zacatecas sobre el crecimiento y la formación de biocapa por *Streptococcus mutans*.

### **3.2 Objetivos particulares.**

- Determinar el efecto del extracto etanólico de propóleo sobre el crecimiento de la bacteria cariogénica *Streptococcus mutans*.
- Determinar la capacidad del extracto etanólico de propóleo para inhibir la formación de la biocapa producida por *Streptococcus mutans*.
- Cuantificar la cantidad de fenoles y flavonoides totales del extracto etanólico de propóleo de Zacatecas.

#### **4. Desarrollo experimental.**

##### **4.1 Recolección del material vegetal.**

La muestra de propóleo fue colectada en el año 2017, en el estado de Zacatecas (Figura 3) en la localidad de Fresnillo, localizada en las coordenadas 23°10'19"N,102°51'39"O, en una zona des pastizal, donde las especies son: zacatón, liendrilla, zacate tres barbas, zacate navajita y zacate chino. El clima de esta región es semiseco templado con lluvias en verano (91.6%), templado subhúmedo con lluvias en verano (8.3%) y seco templado con lluvias en verano (0.1%). Dentro de la misma localidad, se encuentra una zona de bosque donde las especies principales son pino blanco, pino chino, piñón y encino colorado (INEGI, 2018).



**Figura 3.** Localización geográfica del estado de Zacatecas. Obtenida de INEGI, 2018.

##### **4.2 Preparación del extracto de propóleo.**

La muestra de propóleo (25 g) se extrajo con etanol (250 mL) durante 7 días. Este extracto se llevó a sequedad bajo presión reducida en un rotaevaporador IKA

RV10 para obtener el extracto etanólico de propóleo (EEP) y se mantuvo a -20 °C hasta su análisis.

### **4.3 Microorganismo de prueba**

Como modelo de estudio se utilizó la bacteria cariogénica *Streptococcus mutans* ATCC 10449. Para reactivar la bacteria se empleó caldo BHI, en el cual se inoculó 40 µL del cultivo conservado en congelación y se incubó a 37°C por 48 horas. Con un cultivo nuevo de 6 hr se realizaron las diluciones necesarias para obtener una concentración bacteriana de  $1 \times 10^6$  UFC/mL de la bacteria a utilizar durante el ensayo.

### **4.4 Evaluación de la actividad antibacteriana.**

#### **4.4.1 Concentración mínima inhibitoria y Concentración mínima bactericida**

Para el análisis de los resultados se consideraron los conceptos de CMI y CMB tal como sigue: CMI de un agente antimicrobiano es la mínima concentración que inhibe la multiplicación y producción de un crecimiento visible de una cepa bacteriana dada un sistema de prueba. Se obtuvo la Concentración Mínima Inhibitoria utilizando las recomendaciones del CLSI. La CMB se definió como la concentración del EEP a la cual no se observó crecimiento bacteriano después de resembrar los pozos en los cuales no existió crecimiento bacteriano en el ensayo de MIC.

#### **a) Preparación de las muestras a evaluar.**

El extracto etanólico de propóleo fue evaluado. Dada la naturaleza química de la muestra a valorar se solubilizó agregando 800 µl de agua destilada y 200 µl de DMSO, sonicando a temperatura ambiente.

La determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias se realizó de acuerdo con la metodología descrita por Rivero-Cruz y colaboradores (2012), utilizando el método de microdilución en placa de 96 pozos. El valor de CMI fue definido como la concentración mínima del compuesto de prueba que inhibe el crecimiento bacteriano en el pozo de dilución. A continuación, se describe la técnica utilizada (Figura 4).

En cada uno de los pozos se colocaron 100  $\mu$ L de medio de cultivo infusión cerebro corazón (BHI). En la primera línea se adicionaron 100  $\mu$ L de compuesto de prueba del cual se realizaron diluciones seriadas. Después se agregaron 80  $\mu$ L de medio de cultivo con sacarosa al 1 % (*m/v*) en todos los pozos. Posteriormente se adicionaron 20  $\mu$ L del microorganismo de prueba *S. mutans*, previamente ajustado a una concentración de  $1 \times 10^6$  UFC/mL.

Como controles se emplearon tres controles: DMSO al 10% (200  $\mu$ L de DMSO + 800  $\mu$ L de agua), como control negativo medio BHI sin extracto etanólico de Zacatecas y como control positivo gluconato de clorhexidina. Finalmente, las placas fueron incubadas en condiciones aerobias durante 24 horas a 37°C en una incubadora Thermo Symphony. El crecimiento se estimó utilizando un lector de placas Biotek Epoch con un límite de absorbancia de 0.05 a 660 nm. La CMI se determinó por triplicado.

La determinación del MBC se realizó siguiendo la metodología descrita en la literatura, para corroborar los resultados a cada uno de los pozos de la placa se le adicionó en condiciones estériles 0.020 mL de resazurina y se incubaron una hora a 37 °C. Finalmente se realizó la lectura de la absorbancia a 570 nm. LA CMB se determinó por triplicado.

La resazurina es un indicador redox que permite detectar la viabilidad de las células por la conversión de una tinción no fluorescente a un color rojo altamente fluorescente en respuesta a una reducción química del medio de cultivo resultado del crecimiento celular. La reducción de la resazurina puede monitorizarse midiendo la absorbancia, esta señal colorimétrica generada del ensayo es proporcional al número de células vivientes en la muestra (Anoopkumar *et al.*, 2005).

El uso de clorhexidina como control positivo se utilizó debido a que la mayoría de los estudios refieren a la clorhexidina al 0.12 % como el enjuague más usado para el cuidado y mantenimiento de la salud bucal. La clorhexidina es una bisguanida y es actualmente el más potente agente quimioterapéutico contra el *Streptococcus mutans*, tiene actividad bactericida contra Gram positivas y Gram bacterias negativas. La clorhexidina es considerada el estándar de oro y es efectivo contra la gingivitis y periodontitis, evitando la formación de la biopelícula, reduciendo la

adsorción de glucoproteínas salivares en la superficie dental, mediante el bloqueo de los grupos ácidos libres, tales como sulfatos, carboxilos y fosfatos.

Impide que las bacterias se unan a la biopelícula adquirida ya existente, mediante los grupos negativos de la superficie celular bacteriana (por ejemplo, ácidos teicoicos). Además, desestabiliza y penetra las membranas de las células bacterianas, precipita el citoplasma e interfiere con la función de la membrana, inhibiendo la utilización de oxígeno, lo que ocasiona una disminución de los niveles de ATP y la muerte celular (Santos, 2003). A continuación, se muestra un esquema de la distribución de cada uno de los pozos.

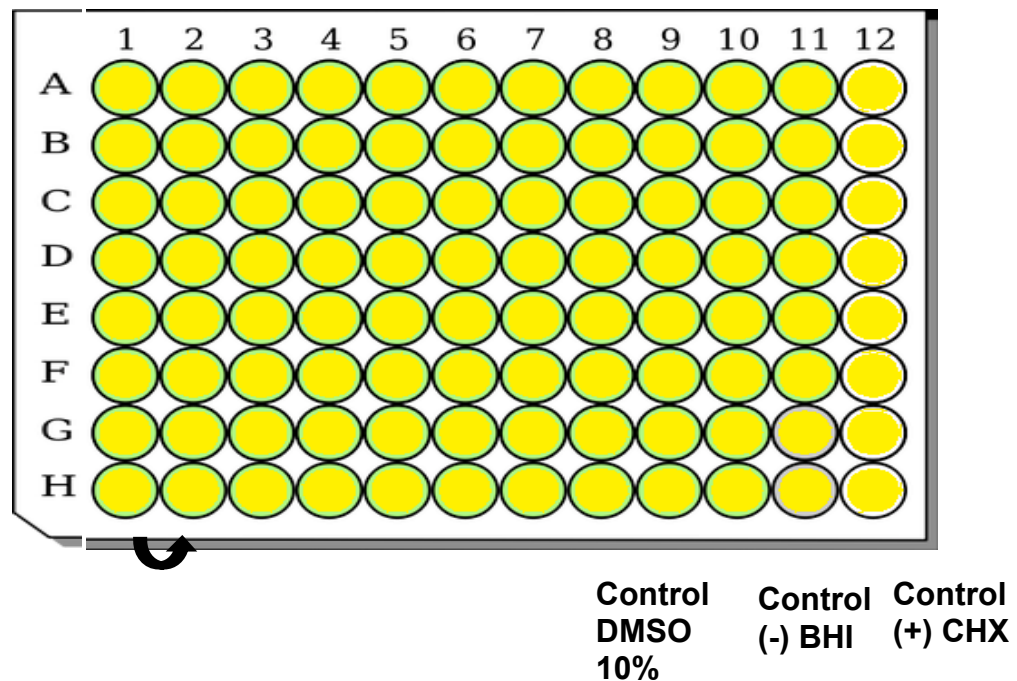


Figura 4. Esquema de placa de 96 pozos utilizada en el ensayo de CMI

#### 4.4.2 Evaluación del EEP sobre la formación de la biocapa producida por *S. mutans*.

El cultivo reactivado de la cepa de *S. mutans* fue resembrado en caldo BHI e incubado durante 4 horas (tal como se describió previamente) posteriormente, la



suspensión celular fue ajustada a una concentración de  $1 \times 10^6$  UFC/mL utilizando un espectrofotómetro.

Para la determinación del efecto del compuesto de prueba sobre la formación de la biocapa producida por *S. mutans* se empleó una modificación a la metodología descrita por (Nassar *et al.*, 2012), utilizando placas estériles de poliestireno. En cada uno de los pozos se colocaron 2 mL de medio de cultivo BHI enriquecido con sacarosa al 1 % (m/v), la sustancia a probar y posteriormente se inocularon con 100  $\mu$ L de la suspensión celular de *S. mutans*.

Como control positivo se utilizó digluconato de clorhexidina al 0.12 % y como control negativo se utilizó la bacteria sin tratamiento. Como control de disolvente se utilizó DMSO en una concentración de 2.5 % (v/v). Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado.

Las placas fueron incubadas en condiciones aerobias durante 48 horas a 37 °C. Después del tiempo de incubación, se retiró el medio de cultivo y las placas fueron lavadas con agua desionizada estéril con el fin de remover las células no adheridas. La biocapa fue fijada adicionando 1 mL de formaldehído al 10 % (v/v). Las placas se dejaron reposar durante 24 horas a temperatura ambiente. Después de este periodo, el formaldehído fue removido.

Posteriormente, se añadieron 200  $\mu$ L de cristal violeta al 1% a cada pozo; las placas fueron incubadas a temperatura ambiente durante 45 minutos. La solución de cristal violeta fue removida y 250  $\mu$ L de isopropanol (100%) fueron adicionados en cada pozo. La absorbancia fue determinada a 565 nm en un lector de placas.

El 100 % de adhesión fue definido como la absorbancia correspondiente al control negativo (sin tratamiento). Con base en los resultados de absorbancia de los pozos, se calculó el porcentaje de inhibición de formación de biocapa del compuesto de prueba.

#### **4.5 Cuantificación de fenoles totales.**

Se realizó utilizando la técnica descrita por Singleton y colaboradores (1965) y el reactivo de Folin-Ciocalteu. En una placa de 96 pozos se agregaron los siguientes reactivos; 20  $\mu$ L del extracto de prueba (1 mg/mL), 160  $\mu$ L de agua desionizada, 20  $\mu$ L de reactivo de Folin-Ciocalteu, para posteriormente dejar reposar la mezcla

durante 8 minutos en la oscuridad. Finalmente, se adicionaron 10  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 20% y se mantuvo dicha mezcla en la oscuridad durante 1 hora. Posteriormente, se realizó una lectura de la absorbancia en un espectrofotómetro a 700 nm. Se construyó una curva de calibración de ácido gálico en un rango de concentración de 5-100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para posteriormente interpolar los resultados. El contenido de fenoles totales se expresó como equivalentes de ácido gálico (mg de equivalentes de ácido gálico/g muestra). Cada determinación se hizo por triplicado y de manera independiente. Los resultados se expresan como el promedio de estas determinaciones.

#### **4.6 Cuantificación de flavonoides totales.**

Se realizó utilizando la técnica de Marquele *et al.*, 2005. A continuación, se describe el método realizado: En una placa de 96 pozos se colocó 100  $\mu\text{L}$  del extracto de prueba (1 mg/mL) y 100  $\mu\text{L}$  de una solución etanólica de  $\text{AlCl}_3$  al 2%, la mezcla se incubó durante 30 minutos, posteriormente se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro a 420 nm y se construyó una curva de calibración de quercetina en un rango de 10-60  $\mu\text{g}/\text{mL}$  con la finalidad de interpolar y obtener la concentración de flavonoides. El contenido total de flavonoides se calculó como equivalentes de quercetina (mgEQ/g de muestra de propóleo). Cada determinación, se realizó por triplicado y de manera independiente. Los resultados se expresan como el promedio de estas determinaciones.

### **5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.**

En el presente trabajo se determinó el contenido de flavonoides y fenoles totales contenidos en el extracto etanólico derivado de una muestra de propóleo recolectada en Zacatecas. Además, se determinó el efecto del extracto sobre el crecimiento de *S. mutans* y su capacidad para inhibir la formación de su biocapa.

#### **5.1 Cuantificación de fenoles y flavonoides.**

La concentración de fenoles y flavonoides totales obtenidos del extracto etanólico del propóleo recolectado en Zacatecas se presenta en el Cuadro 5.

**Cuadro 5.** Contenido de fenoles y flavonoides totales en el EEP de Zacatecas.

Muestra	Fenoles totales (eq. EAG/g exto)	Flavonoides totales (eq. EQ/g exto)
Zacatecas	109.0 ± 2	70 ± 1

El contenido de fenoles totales está expresado como miligramos de equivalentes de ácido gálico por gramo de extracto (mg eq. EAG/ g extracto). El contenido de flavonoides totales está expresado como miligramos de quercetina por gramo de extracto (mg eq. EQ/ g extracto).

De acuerdo con la Norma Mexicana del Propóleo (NOM-003-SAG/GAN-2017) un propóleo para considerarse de buena calidad debe tener un contenido mínimo de fenoles totales no menor a 50 mg EAG/g EEP. Por otra parte, para los flavonoides, el contenido debe ser no menor a 5 mg EQ/ g EEP. El contenido de fenoles y flavonoides totales del EEP de Zacatecas fue de 109.0 ± 2 eq. EAG/g exto y 70 ± 1 eq. EQ/g exto, respectivamente. Estos contenidos superan los mínimos requeridos en la NOM mexicana para ser considerados como de buena calidad. Estos resultados muestran que, el EEP contiene compuestos fenólicos a los cuales se les puede atribuir en buena parte las actividades antioxidantes y antibacterianas encontradas para este extracto. El contenido de fenoles es uno de los criterios más utilizados para determinar la calidad del propóleo (Zhang *et al.*, 2014). Así como los flavonoides son un determinante para medir el potencial antioxidante de una muestra de propóleo. En estudios previos se ha demostrado que el propóleo a comparación de otros productos apícolas presenta mayor cantidad de fenoles (Ozkok *et al.*, 2017).

Comparando el contenido de fenoles y flavonoides totales del EEP de Zacatecas con los reportados en estudios previos encontrados en la literatura, muestras de propóleo de diferentes regiones de México, obtuvieron un contenido aproximado de 24.7 eq. EAG/g exto y 2.3 eq. EQ/g exto para el estado de Puebla, Oaxaca 12 eq. EAG/g exto y 1.3 eq. EQ/g exto y Tlaxcala 23.5 eq. EAG/g exto y 3.1 eq. EQ/g exto respectivamente, obtuvieron un contenido de fenoles y flavonoides totales

por debajo de lo establecido por la Norma Oficial Mexicana (Rivero-Cruz *et al.*, 2017). La variabilidad de resultados obtenidos en cada región es debido a una diversidad particular en la flora existente, donde las abejas toman la materia prima para producir propóleos, cambiando así la composición química del propóleo producido en cada zona geográfica, de allí la importancia que cada región evalúe las propiedades antimicrobianas de los propóleos autóctonos (Toreti *et al.*, 2013). Entre los factores que influyen en estos cambios se puede mencionar a la vegetación, condiciones climáticas y origen genético de las abejas (Naugraheni *et al.*, 2016).

## **5.2 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y de la Concentración Bactericida Mínima (MBC)**

La CMI para el EEP fue de 0.13 mg/mL, dicho resultado es mayor al obtenido para el control positivo digluconato de clorhexidina (0.032 mg/mL). Estos resultados permitieron confirmar que el EEP recolectado en Zacatecas inhibe el crecimiento de la bacteria. Respecto a la técnica empleada, Reller y Weinstein (2009) señalan que la microdilución se considera un buen método para probar de manera rápida y simultánea un gran número de muestras. Ríos y colaboradores (1988) consideran que un extracto vegetal es activo si su CMI es menor o igual a 1.0 mg/mL cuando se utiliza el método de microdilución en placa. Con base en este criterio se determinó que el extracto presenta actividad biológica sobre el crecimiento de la bacteria cariogénica *S. mutans*. Diversos estudios publicados en los que se prueba la capacidad antibacteriana de los propóleos indican que estos, son mucho más efectivos frente a bacterias Gram positivas (Tivieron *et al.*, 2016). Korua y colaboradores (2007) en un estudio *in vitro* de muestras de propóleo de diferentes orígenes geográficos sobre nueve bacterias patógenas de la cavidad oral determinaron que las bacterias Gram positivas son más sensibles al extracto etanólico de propóleo que las Gram negativas.

Velázquez y colaboradores (2007) evaluaron la actividad antimicrobiana de muestras de propóleos colectadas en diferentes zonas de Sonora. Los microorganismos utilizados para este estudio fueron bacterias Gram positivas (*S. aureus*, *E. faecalis* y *L. monocytogenes*) y Gram negativas (*E. coli* y *P. aeruginosa*), utilizando extractos etanólicos de propóleos (400, 200, 100 y 50 µg).

En todas las concentraciones de propóleo evaluadas no se observó efecto sobre las bacterias Gram negativas. Por otra parte, sobre las bacterias Gram positivas, el *S. aureus* fue el microorganismo sobre el que se encontró la más alta efectividad. Esta actividad fue correlacionada con la presencia de algunos compuestos fenólicos: acacetina, CAPE, crisina, galangina, pinocembrina y naringenina.

Los resultados descritos en las investigaciones previas pueden deberse a la diferencia en la composición química de la pared celular de las bacterias que permiten la entrada de los principios activos del propóleo en algunos casos. La pared celular en las bacterias Gram negativas está compuesta por varias capas y es bastante compleja, mientras que la pared en las Gram positivas está formada sólo por un tipo de molécula, esta diferencia puede contribuir a la susceptibilidad de este grupo de bacterias a la acción de los principios activos del propóleo (Madigan *et al.*, 2004).

La clorhexidina utilizada en este estudio como control positivo, presenta actividad antimicrobiana debido al desorden ocasionado en la membrana citoplásmica. Uno de los principales efectos es el de alterar el equilibrio osmótico y causar la formación de la biocapa (Lang *et al.*, 1976).

Sin embargo, algunos estudios revelan que el uso de agentes quimioterapéuticos comerciales anticaries como la clorhexidina; tiene varios efectos secundarios tales como manchas en los dientes y la aparición de resistencia bacteriana. Esto debido por el uso de concentraciones y/o tiempos de exposición insuficientes que puede conceder ventaja a las bacterias más resistentes (Ban *et al.*, 2012).

En estudios previos, se han reportado compuestos naturales que inhiben la actividad de las enzimas GTFs. Entre ellos se mencionan los flavonoides, terpenoides y las hidroxiflavonas. Por otra parte, en este mismo estudio se encontró que la mayoría de los compuestos probados, incluidos los enjuagues bucales disponibles comercialmente, no inhibieron la actividad de las GTFs eficazmente (Koo *et al.*, 2002).

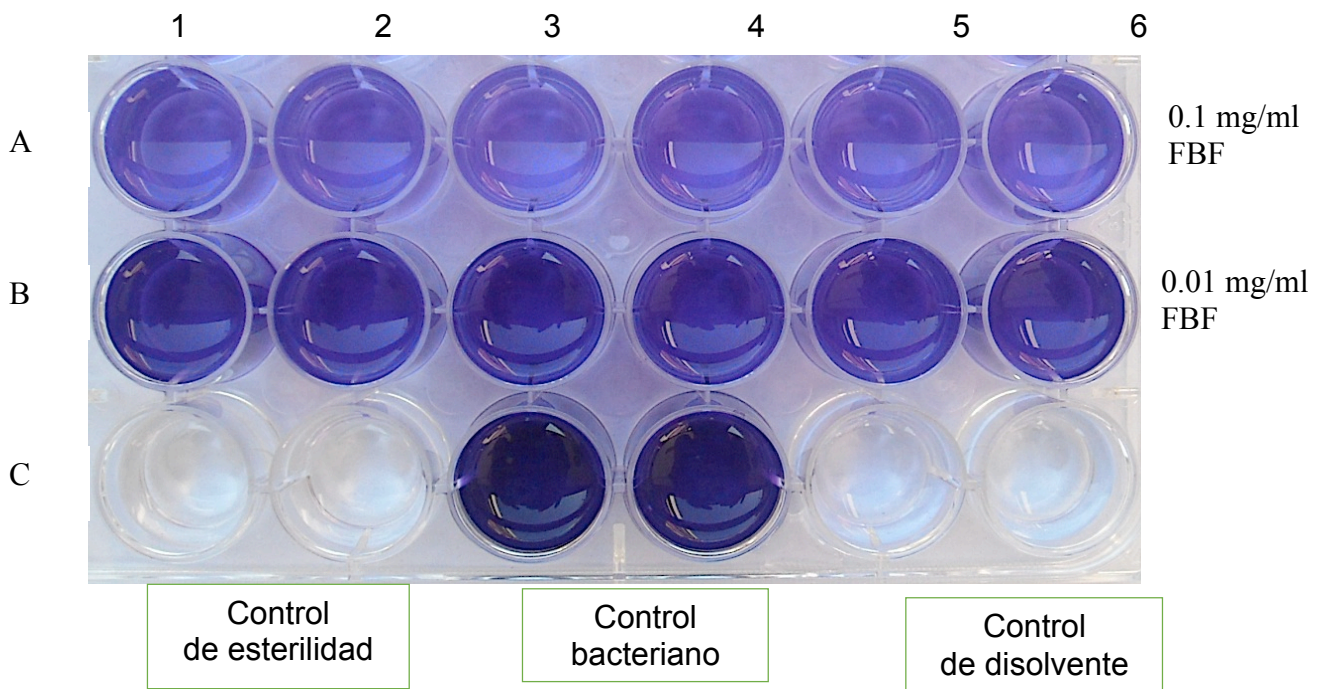
La MBC para el EEP fue de 1.04 mg/mL, este resultado es comparable con los reportados por Dziejic y colaboradores (2013) en un estudio realizado para

conocer el efecto de un propóleo recolectado en Polonia sobre bacterias del grupo mutans.

Existen muy pocas investigaciones acerca del mecanismo por el cual los propóleos actúan frente a las bacterias. Byan *et al.*, 2016. Demostraron por medio de microscopía electrónica que el mecanismo de acción de estos se asocia más a un daño funcional que estructural, ya que una vez que la bacteria se encuentra frente a este tratamiento el EEP se une a la membrana, resultando en lisis celular y eventualmente a muerte bacteriana.

### 5.3 Evaluación del EEP sobre la formación de la biocapa producida por *S. mutans*.

Para la determinación del efecto del EEP sobre la formación de la biocapa monoespecie producida por la bacteria cariogénica *Streptococcus mutans* se utilizó el ensayo de cristal violeta. Como resultado, se observó una inhibición de la formación de la biocapa dependiente de la concentración. En la Figura 5 se observa la inhibición de la formación de la biocapa producida por *S. mutans* a concentraciones de 0.1 mg/mL del EEP se obtuvo un porcentaje de inhibición de 38.7624% (A). En la fila C se observan los controles de esterilidad, bacterias sin tratamiento y el control de disolvente, respectivamente.



**Figura 5.** Efecto sobre la formación de la biocapa por *S. mutans* utilizando el ensayo de cristal violeta.

Como se mencionó con anterioridad, la determinación del efecto sobre la formación de la biocapa por la especie *S. mutans* se realizó empleando una modificación a la metodología descrita por Nassar *et al.*, 2012. En este método se consideró a la medida de absorbancia del carril sin tratamiento como el 100 % de adhesión, y tomando este resultado como referencia, se calculó el porcentaje de inhibición.

*Streptococcus mutans* sintetiza glucanos extracelulares a partir de la sacarosa mediante la utilización de GTFs. Los glucanos promueven la acumulación de estreptococos cariogénicos y otros microorganismos orales en la superficie dental, y son críticos para la formación e integridad estructural de los biocapas (Cury *et al.*, 2000; Marsh, 2004).

Gran número de estudios sugiere que algunos productos naturales con alto contenido de polifenoles tienen importantes efectos sobre los factores de virulencia de *S. mutans* ya que actúan impidiendo la formación de biocapas y coagregados bacterianos al inhibir la actividad de las GTFs, así como la adherencia de los microorganismos a diferentes superficies. Por ejemplo, se ha reportado que algunos ácidos orgánicos (ácido ascórbico, ácido ferúlico, ácido cafeico) son compuestos que inhiben el crecimiento de algunas bacterias. (Weis *et al.*, 2002, Steinberg *et al.*, 2004; Yamanaka *et al.*, 2004).

Existen algunos reportes como el de Griglione, 2013, quien evaluó el efecto del propóleo sobre biopelículas de *Fusobacterium nucleatum* en el que se obtuvo un efecto inhibitorio a concentraciones extremadamente altas de propóleos (1562,5 µg/mL) pero no efecto bactericida. Por otra parte, Kouidhi *et al.*, 2010, Wojtyczka *et al.*, 2013 y Grenier *et al.*, 2015, concuerdan en que el propóleo es capaz de inhibir la formación de biopelículas bloqueando la fase de adherencia en *Streptococcus spp.*, *Staphylococcus epidermidis* y *Candida albicans*, por lo que sugieren un uso prometedor en la prevención de enfermedades producidas por la formación de biopelículas.

Dogan *et al.*, 2014 evaluaron la biopelícula ya formada de *Pseudomonas fluorescens* donde observaron la destrucción significativa de esta después de la exposición a EEP Turcos por 48 horas pero a concentraciones más altas que las necesarias para inhibir la formación de este.



## 6. CONCLUSIÓN.

El extracto etanólico del propóleo de Zacatecas tuvo un contenido de  $109.0 \pm 2$  eq. EAG/g exto y  $70 \pm 1$  eq. EQ/g exto para fenoles y flavonoides totales, respectivamente. Estas concentraciones cumplen con el criterio de calidad establecido en la NOM-003-SAG/GAN-2017.

Por otra parte, el extracto de propóleo tuvo actividad sobre el crecimiento de *S. mutans* con una CMI de 0.13 mg/mL. Esta actividad puede considerarse como baja si se compara con la CMI (0.032 mg/mL) obtenida para el digluconato de clorhexidina que se utilizó como control positivo

Por último, el EEP fue capaz de inhibir la formación de la biocapa por *S. mutans* en un 38.76 %.

## **7. PERSPECTIVAS**

Continuar la evaluación del efecto del EEP de Zacatecas frente a otras bacterias Gram (+) y Gram (-); así como determinar el mecanismo por el cual el extracto etanólico inhibe la formación de biopelículas.

Continuar con el fraccionamiento el extracto de propóleo colectado en Zacatecas y aislar los compuestos activos.

## 8. Referencias Bibliográficas.

Akopyan, Z.M., Shakaryan, G.A., Danielyan, S.G., 1970. Sensitivity of microorganism to propolis in some districts of the Armenian S.S.R. *Biol. Zh. Armeniya*, 23, 70-74.

Alves, F. 2007. Antimicrobial and Physico-Chemical Characterization of Propolis of *Apis mellifera*. *Biosci Biotechnol. Biochem.* 58, 945-946.

Anoopkumar, D.S., Carey, J.B., Conere, T., Sullivan, E., Van Pelt, F.N., Allshire, A., 2005. Resazurin assay of radiation response in cultured cells. *Br. J. Radiol.* 78, 945-947.

Aoki, H., Shiroza, M., Hayakawa, S., Sato, Kuramitsu, H.K., 1986. Cloning of a *Streptococcus mutans* glucosyltransferase gene coding for insoluble glucan synthesis. *Infect. Immun.* 53, 587-594.

Asís, M., 1989. Los productos de la colmena. Centro de información y documentación agropecuaria. Capítulo 4. Vedado. 45-52.

Ban, S.H., Kim, J.E., Pandit, S., Jeon, J.G., 2012. Influences of *Dryopteris crassirhizoma* extract on the viability, growth and virulence properties of *Streptococcus mutans*. *Molecules.* 17, 9231-44.

Banskota, H., Tezuka, Y; Kadota., S; 2001. Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytother. Res.* .15, 561-571.

Bankova, V; L. de Castro, S; Marcucci, M; 2000. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie.* 31, 3-15.

Beighton, D., 2005. The complex oral microflora of high-risk individuals and groups and its role in the caries process. *Community Dentistry and Oral Epidemiology.* 33, 248–255.

Bowen W. H., Koo H., 2011. Biology of *Streptococcus mutans*-derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. *Caries Research*. 45, 69–86.

Bracho, J; 2003. Calidad de propóleos de origen argentino. Propiedades organolépticas. *Vida Apícola*. 18, 52-59.

Brushi, ML; Franco, SL; Gremiao, MP; 2003. Application of an HPLC Method for Analysis of Propolis Extract. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 26, 2399-2409.

Bryan, J., Redden, P., Traba, C., 2016. The mechanism of action of Russian propolis ethanol extracts against two antibiotic-resistant biofilm-forming bacteria. *Lett. Appl. Microbiol.* 62, pp. 192-198.

Burdock, G.A; 1998. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. *Food Chemistry. Toxicol.* 36, 347-363.

Castaldo, S; Capasso, F; 2002. Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*. 73, S1-S6.

Castrillón, L., 2010. Importancia de las biopelículas en la práctica médica. *Dermatología Revista Mexicana*. 54, 14-24.

Chaillou, L.L., Herrera, H.A., Maidana, J.F., 2004. Estudios de propóleos de Santiago del Estero. Argentina. *Ciencia y Tecnología de Alimentos*. 24, 11-15.

Clinical and Laboratory Standards Institute. 2018. CLSI Breakpoint changes on Microbiology Laboratories and Antimicrobial Stewardship Programs.

Cury, J.A., Rebelo, M.A., Derbyshire, M.T., Tabchoury, C.P., 2000. Biochemical composition and cariogenicity of dental plaque formed in the presence of sucrose or glucose and fructose. *Caries Research*. 34, 491–497.

Danese, P; Kolter, R; Pratt, A; 2000. Exopolysaccharide production is required for development of *Streptococcus mutans* K-12 biofilm architecture. *J Bacteriol.* 182, 3593-3596.

Diaz, C., 2011. Descripción de biofilm, desarrollo e importancia de su estudio. Impacto de las técnicas de micro-nanofabricación en sistemas biológicos. Adherencia y colonización de *Pseudomonas fluorescens* sobre sustratos sólidos: influencia de la topografía y composición química de la superficie. Facultad de Ciencias Exactas. 4-14.

Dziedzic, A., Kubina, R., Wojtyczka, R. D., Kabala-Dzik, A., Tanasiewicz, M. y Morawiec, T. 2013. The Antibacterial effect of ethanol extract of polish propolis on mutans Streptococci and Lactobacilli isolated from saliva. *Evid-Based Complementary Altern Med.* 1-11.

Dogan, N., Doganli, G., Ülger, G., Habesoglu, D., Güzel, S., Yasar, Y., Arar, D., Sensoy, T., Bozbeyoglu, N., 2014. Antibiofilm effect of two propolis samples from Turkey. *J. Appl. Biological Sci.* 8, 27-31.

Escribano, M; Matesanz, P; 2005. Pasado, presente y futuro de la microbiología de la periodontitis. *Avances en Periodoncia e Implantología Oral.* 17,79-87.

Farooqui, T., Farooqui, A.A., 2012. Beneficial effects of propolis on human health and neurological diseases. *Frontiers in bioscience.* 4, 779-793.

Farré, R., Frasquet, I; Sánchez, A; 2004. Propolis and human health. *Ars Pharmaceutica.* 45, 21-43.

Fátima RS., 2008. Algunas consideraciones sobre caries dental, fluoruros, su metabolismo y mecanismos de acción. *Acta Odontológica Venezolana.* 46, 1-11.

Filoche, SK; Soma, K; Sissons, Ch; 2005. Antimicrobial effects of essential oils in combination with chlorhexidinedigluconate. *Microbiology Immunology.* 20, 221-225.

Flemming, H.-C., Wingender, J., 2010. The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology* 8, 623-633.

Gamboa, F; Estupiñán, M; Galindo, A; 2004. Presence of *Streptococcus mutans* in saliva and its relationship with dental caries: Antimicrobial Susceptibility of the Isolates. *Univ Sci.* 9, 23-7.

Ghislberti, L; 1979. Biological effect of bee propolis. *Department of Organic Chemistry.* 60, 59-84.

Grenier, I., De Souza, P., Arita, G., Araújo, R., Lopes, M., Bruschi, M., Negri, M., 2015. Propolis is an efficient fungicide and inhibitor of biofilm production by vaginal *Candida albicans*. *Evid-Based Complementary Altern Med.*1, 1-9.

Griglione, A., 2013. Efficacy of propolis against *Fusobacterium nucleatum* biofilm. Indiana University.

He, X., Li, C., Wei, Z., Wang, J., Kou, J. 2016. Protective role of apigenin in cisplatin-induced renal injury. *Eur. J. Pharmacol.* 789, 215-221.

Inaba H, Amano A., 2010. Roles of Oral Bacteria in Cardiovascular Diseases - From Molecular Mechanisms to Clinical Cases: Implication of Periodontal Diseases in Development of Systemic Diseases. *J. Pharmacol. Sci.* 113,103-9.

Karunakaran, E., Mukherjee, J., Ramalingam, B., Biggs, C., 2011. "Biofilmology": a multidisciplinary review of the study of microbial biofilms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 90, 1869-1881.

Koneman, E.W; 2008. Microbiological diagnostic in dental caries. *Sist. Bacteriol.* 39, 314-318.

Konig, B; 1985. Plant sources of propolis. *Bee world.* 66, 136-139.

Koo, H; Rosalen, P; Cury, J; Park, Y; Bowen, W; 2002. Effects of compounds found in propolis on *Streptococcus mutans* growth and on glucosyltransferase activity. *Antimicrob Agents Chemother.* 46, 1302-1309.

Korua ,O., Toksoyb, F., Han, C., 2007. In vitro antimicrobial activity of propolis samples from different geographical origins against certain oral pathogens. *Anaerobe.* 13, 140-145.

Kouidhi, B., Zmantar, T., Bakhrouf, A.,2010. Anti-cariogenic and antibiofilms activity of Tunisian propolis extract and its potential protective effect against cancer cells proliferation. *Anaerobe.* 16, 566-71.

Kraigsley, A; Rooney, PD; Finkel, S; 2002. Hydrodynamic influences biofilm formation and growth. University of Southern California. *Depart. Microbol.*293,135-40.

Kumar, S., Pandey, A., 2013. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An overview. *The Scientific World Journal.* 1-16.

Kumazawa, S., Hamasaka, T., Nakayama, T. 2004. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of Korea. *Food Chem.* 84,329–339.

Kuropatnicki, A.K; Szliszka, E; Krol, W; 2013. Historical aspects of propolis research in modern times. *Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM.* 64-149.

López, R; 2006. Propóleo Composición y beneficios. México. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos.* 4,41-44.

Lotti, C., Campo, F., Piccinelli, O; Cuesta-Rubio, I; Márquez, H; Rastrelli, L; 2010. Chemical constituents of red Mexican propolis. *J. Agric. and Food Chem.* 58, 2209-2213.

Madigan, M., Martinko, T., Parker, J., Brock. 2004. *Biología de los microrganismos*, 10ª edición, Ed. Pearson-Prentice Hall, Madrid, España.

Magaña, M; Aguilar, A; Lara, P; Sanginés, J; 2007. Caracterización socioeconómica de la actividad apícola en el estado de Yucatán, México. *Agronomía*, Universidad de Caldas, Colombia. 15,17-24.

Marcucci, M; 1995. Propolis: Chemical Composition, Biological Properties and Therapeutical Activity. *Apidologie*. 26, 83-99.

Marquele, F.D., Di Mambro, V.M., Georgetti, S.R., Casagrande, R., Valim, Y.M.L., Fonseca, M.J.V. 2005. Assessment of the antioxidant activities of Brazilian extracts of propolis alone and in tropical pharmaceutical formulations. *J. Pharm. Biomed.* 39, 455-462.

Marsh P.D., 2003. Are dental diseases examples of ecological catastrophes. *J. Microbiology*. 149, 279–294.

Martínez, J; García, P; Durango, R; Gil, G; 2012. Caracterización de propóleos provenientes del municipio de Caldas obtenido por dos métodos de recolección. *Revista MVZ Córdoba*. 17, 2861-2869.

Mendizabal, F; 2005. Abejas. Buenos Aires-República de Argentina. *Revista Iberoamericana de Bioeconomía y Cambio Climático*. 2,1-19.

Mitscher, L., 2000. Some Transpacific Thoughts on the Regulatory Need for Standardization of Herbal Medical Products. *J. Food and Drug Anal.* 8, 229-234.

Moreno, M.I; Isla, M.I; Sampietro, A.R; Vattuone, M.A; 2000. Comparision of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *J. ethnopharmacol.* 71, 109-114.



- Nassar, H.M., Li, M., Gregory, R.L., 2012. Effect of Honey on *Streptococcus mutans* growth and biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 536-540.
- Negróni, M., 2009. *Microbiología Estomatológica Panamericana*. 235-245.
- Norma Oficial Mexicana para el propóleo. NOM-003-SAG/GAN-2017.
- Nugraheni, Z.V., Zetra, Y., Trianita, A.M., Syahputra, M.Y., Firmany, A.R., 2016. Antioxidant activity in natural beehives (*Apis mellifera*) bioactive compound from Malang, Indonesia. *ALP Conf. Proc.* 1729.
- OMS, OPS. Estrategia de la Organización Mundial de la Salud sobre Medicina Natural y Tradicional, 2002-2005.
- Palomino, G., Martínez, G., García, P; Durango, R; 2010. Caracterización fisicoquímica y actividad antimicrobiana del propóleo en el municipio de La Unión (Antioquia, Colombia). *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*. 63, 5373-5383.
- Perez A. 2005. Biopelícula: una nueva visión de la placa dental. *Rev. Estomatol. Hered.* 15, 82 – 85.
- Quivey, R.G., Jr., Kuhnert, W.L., Hahn, K., 2000. Adaptation of oral Streptococci to low pH. *Advances in Microbial Physiology*. 42, 239–27.
- Rivero-Cruz, J.F., 2012. Ethnobotanical survey and antibacterial activity of plants used in the Altiplane region of Mexico for the treatment of oral cavity infections. *J. Ethnopharmacol.* 141, 860–865.
- Rocha, N; 2004. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol. Rev.* 50, 353.
- Rölla, G., J. E. Ciardi, K. Eggen, W. H. Bowen, and J. Afseth. 1983. Free glucosyl- and fructosyltransferase in human saliva and adsorption of these enzymes to teeth

in vivo, p. 21-30. Glucosyltransferases, glucans, sucrose, and dental caries. *Chem. Senses*. 17, 85-89.

Santos, A; 2003. Evidenced-based control of plaque and gingivitis. *J. Clinical Periodontol.* 30,13-16.

SAGARPA; Coordinación General de Ganadería. 2010. Situación actual y perspectiva de la apicultura en México. *Claridades Agropecuarias*. 199, 3-34.

Salatino, AS; Fernandes-Silva, C.C; Righi, A.A; Salatino, M.L; 2011. Propolis research and the chemistry of plant products. *Nat. Prod. Rep.* 28, 925-936.

Schilling, K. M., and W. H. Bowen. 1992. Glucans synthesized in situ in experimental salivary pellicle function as specific binding sites for *Streptococcus mutans*. *Infect. Immun.* 60,284-295.

Singleton, V.L., Rossi, J., 1965. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*. 16, 144-158.

Stewart, P; 1996. Theoretical aspects of antibiotic diffusion into microbial biofilms. *Antimicrobial Agents Chemother.* 40, 2517-22.

Shukla, S., Gupta, S., 2010. Apigenin: A Promising Molecule for Cancer Prevention. *Pharm Res.* 27, 962-978.

Takahashi, N; Koseki, T; Sato, T; Washio, J; 2005. Hydrogen sulfide-producing bacteria in tongue biofilm and their relationship with oral malodour. *J. Med. Microbiol.* 54, 889-95.

Takaisikikuni, N; Schilcher, H; 1994. Electron microscopic and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance. *Planta Med.* 60, 222-227

- Tanzer, J; Livingston, J; Thompson, A; 2001. The Microbiology of Primary Dental Caries in Humans. *J. Dent Educ.* 65,1028-1037.
- Tolba, MF., Omar, H.A., Azab, S.S., Khalifa, A.E., Abdel-Naim, A.B., Abdel Rahman, S.Z., 2016. Caffeic Acid Phenethyl Ester: A Review of Its Antioxidant Activity, Proctetive Effects against Ischemia-reperfusion Injury and Drug Adverse Reactions. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 56, 2183-2190.
- Tolosa, L., Cañizares, E., 2002. Obtención, caracterización y evaluación de la actividad antimicrobiana de extractos de propóleos de Campeche. *Ars Pharmac.* 43, 187-204.
- Toreti, V.C; Sato, H.H.;Pastore, G.M.; Park, Y.K. 2013. Recent progress of propolis for its biological an chemical compositions and its botanical origin. *Evid. Based Compleent. Alternat. Med.*12, 69390.
- Ueda, T; Inden, M; Shirai, K; Sekine, SI; Masaki, Y; Kurita, H; Hozumi, I; Ichihara, K; Inuzuka, T; 2017. The effects of Brazilian green propolis that contains flavonols against mutant cooper- zinc superoxide dismutase-mediated toxicity. *Science Rep*, 7, 2882.
- Valencia, D; Alday, E; Robles-Zepeda, R; Garibay-Escobar, A; Gálvez-Ruíz, J.C; Salas-Reyes, M; Jiménez-Estrada, M; Velázquez-Contreras, E; Hernández, J; Velázquez, C; 2012. Seasonal effect on chemical composition and biological activities of Sonoran propolis. *Food Chem.*131, 645-651.
- Velázquez, C; 2007. Sonoran propolis: Chemical composition and proliferative activity on cancer cell lines. *Planta med.* 73, 1469-1474.
- Velázquez, C., Navarro, M., Acosta, A., Angulo, A., Dominguez, Z., Robles, R., Robles-Zepeda, R., Lugo, E., Goycoolea, F.M., Velazquez, E.F., Astiazaran, H. y Hernández, J. 2007. Antibacterial and free-radical scavenging activities of Sonoran propolis. *J. Appl. Microbiol.* 103: 1747–1756.

Vidia, D; Bhavna, J; 2011. Propolis mouthwash: A new beginning. *J. Indian Soc. Periodontol.*15, 121-125.

Viuda-Martos, M., Ruiz-Navajas, Y; Fernandez-Lopez, J; Perez-Alvarez, J.A; 2008. Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. *J. Food Sci.* 73, 117-124.

Wojtyczka R, Kępa M, Idzik D, Kubina R, KabaBa-Dzik A, Dziedzic A, Wąsik T. 2013. In Vitro Antimicrobial activity of ethanolic extract of polish propolis against biofilm forming *Staphylococcus epidermidis* strains. *Evid-Based Complementary Altern Med.*1, 1-11

Yaghoubi, S; Ghorbani, R; Soleimanian, S; Satari, R; 2007. Antimicrobial activity of Iranian propolis and its chemical composition. *J. Pharm. Sci.* 15, 45-48.

Yamashita, Y., W. H. Bowen, R. A. Burne, and H. K. Kuramitsu. 1993. Role of the *Streptococcus mutans* GTF genes in caries induction in the specific-pathogen-free rat model. *Infect. Immun.* 61, 3811-3817.