

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN



Código RVR092

ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE ANDAMIOS DE QUITOSANO Y PROPOLEO SOBRE BACTERIAS PATÓGENAS DE INTERÉS ODONTOLÓGICO.

Maldonado, María ; Salas, Elaysa 

Facultad de Odontología, Universidad de Los Andes. Mérida, Venezuela

Autora de contacto: Elaysa Salas

e-mail: elaysalas72@gmail.com

Cómo citar este artículo:

Vancouver: Maldonado M, Salas E. Actividad antimicrobiana de andamios de quitosano y propóleo sobre bacterias patógenas de interés odontológico. *IDEULA*. 2022;(8): 30-48.

APA: Maldonado, M. y Salas, E. (2022). Actividad antimicrobiana de andamios de quitosano y propóleo sobre bacterias patógenas de interés odontológico. *IDEULA*, (8), 30-48.

Recibido: 5-04-2022

Aceptado: 26-05-2022

RESUMEN

Introducción: La cavidad bucal es un ambiente complejo, cuyas características influyen en el microbioma bucal, una de las funciones de la microbiota bucal es impedir la colonización de patógenos exógenos u oportunistas, colaborando con los mecanismos de defensa del hospedador en el control de infecciones. Cuando los antibióticos se usan de manera irracional, los microorganismos se hacen resistentes, de allí que la búsqueda de nuevas moléculas en productos naturales y el diseño de fármacos estén tomando importancia. **Objetivo:** Se evaluó la susceptibilidad de *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella aerogenes* en geles y membranas de quitosano y propóleo a diferentes concentraciones. **Metodología:** Se desarrolló una investigación explicativa de tipo experimental, a través de pruebas *in vitro* utilizando el método de difusión en agar con pozos por triplicado, utilizando clorhexidina como control positivo. El comportamiento de las variables cuantitativas y cualitativas se describió mediante estadística descriptiva. **Resultados:** No se observaron halos de inhibición en las placas tanto para las membranas como para los geles de quitosano y propóleo, se observaron halos de inhibición con Clorhexidina al 0,12%. **Conclusiones:** Es posible que las moléculas bioactivas del propóleo sean atrapadas dentro de la malla de quitosano o que la técnica microbiológica utilizada no provee las condiciones necesarias para favorecer la difusión de la molécula de la membrana al agar. De allí la importancia de probar nuevas técnicas de elaboración del gel de quitosano, así como otras técnicas microbiológicas y biológicas que permitan evidenciar el efecto antibacterial demostrado en otros estudios.

Palabras Clave: quitosano, propóleo, actividad antimicrobiana, membranas, geles.

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF CHITOSAN AND PROPOLIS SCAFFOLDS ON PATHOGENIC BACTERIA OF DENTAL INTEREST.

ABSTRACT

Introduction: The oral cavity is a complex environment, which characteristics influence the oral microbiome. One of the oral microbiome's functions is to prevent the colonization of exogenous or opportunist pathogens, working with the host's defense mechanism in infection control. When antibiotics are used in an irrational way, microorganisms become resistant, this is why the search for new molecules in natural products and drugs design is so important. **Objective:** We evaluated the susceptibility of *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* and *Klebsiella aerogenes* in gels and chitosan membranes supplemented with propolis in different concentrations. **Methodology:** We elaborated experimental explanatory research through *in vitro* tests, using the diffusion in agar with wells in triplicate method, with chlorhexidine as a positive control. The behavior of the quantitative and qualitative variables was described through descriptive statistics. **Results:** There were not observed inhibition halos in the elaborated plates for both membranes and chitosan and propolis gels. They were observed inhibition halos with chlorhexidine in 0,12%. **Conclusion:** It is possible that propolis bioactive molecules get stuck inside the chitosan tights, or maybe the microbiological technique used does not provide the necessary conditions to favor the diffusion of the molecule from the membrane to the agar. This is why it is important to try new techniques for the elaboration of chitosan gel, as well as other microbiological and biological techniques that allow to evidence the antibacterial effect shown in other studies.

Keywords: chitosan, propolis, antimicrobial test, membranes, gels.

INTRODUCCIÓN

La cavidad bucal se considera un ambiente complejo, cuyas características influyen en la composición y actividad de los microorganismos que coexisten en ella. Está compuesta de diversas superficies, cada una de ellas habitada por una gran cantidad de microorganismos, donde algunas bacterias han sido implicadas en enfermedades bucales como la caries, periodontitis e infecciones bacterianas localizadas (tejido blando y de sostén del diente) que presentan factores de riesgo significativos para la salud humana. Entender la microbiota bucal es una tarea compleja, debido a la gran variedad de hábitats que se encuentran dentro de la cavidad bucal y que dependen de las concentraciones de oxígeno, la disponibilidad de nutrientes, la temperatura, la exposición a factores inmunológicos y las características anatómicas, de allí que la aparición de una enfermedad dependerá de factores atribuibles a condiciones del microorganismo, del hospedero^{1,2}.

Sin embargo, la principal función atribuida a la microbiota bucal es impedir la colonización de patógenos exógenos u oportunistas, colaborando con los mecanismos de defensa del hospedador en el control del crecimiento y multiplicación de los microorganismos que moran en los ecosistemas de la cavidad bucal², aunque la mayoría de las infecciones de la cavidad bucal son odontogénicas, habitualmente localizadas y circunscritas, en determinadas circunstancias, algunos miembros de la microbiota habitual pueden comportarse de manera oportunista, dando lugar a infecciones endógenas caracterizadas por ser polimicrobianas y mixtas; que pueden propagarse por continuidad y acceder a los tejidos profundos o, más raramente, diseminarse a distancia por vía linfática o hematogena hasta alcanzar órganos más alejados dando lugar, en uno y otro caso, a procesos de mayor gravedad.³ En este sentido el desequilibrio de la microbiota o fallas en las técnicas odontológicas de control de infección pudieran favorecer la colonización de microorganismos patógenos exógenos con perfiles de resistencia considerables.

Desde el descubrimiento de los antibióticos, el avance de la ciencia y la tecnología y su aplicación en el ámbito de la salud, ha propiciado que la evolución en los tratamientos se desarrolle de una

manera vertiginosa.⁴ Los antibióticos son medicamentos desarrollados para el control de infecciones, sin embargo, se les prescribe de manera indiscriminada y su venta libre, promueve la automedicación, sin reconocimiento médico, ni diagnóstico de la enfermedad, ni seguimiento del tratamiento. Debemos mencionar que, los pacientes consumen dosis inferiores a las recomendadas porque no pueden costear el tratamiento completo o cesan su ingesta al desaparecer los síntomas de la enfermedad⁵.

Cuando los antibióticos se usan de manera irracional, los microorganismos se vuelven resistentes a ellos^{5,6}. La resistencia es un recurso de supervivencia que presenta un microorganismo contra uno o más antimicrobianos a través de mecanismos de resistencia que disminuyen la capacidad microbicida o inhibitoria que poseen tales fármacos⁷. Los mecanismos que pueden utilizar las bacterias varían según la especie o el entorno donde se encuentren⁸, pueden presentarse de dos formas: La Resistencia Intrínseca inherente al microorganismo y es debida a determinantes genéticos cromosomales propios de especies y géneros bacterianos, es decir, se trata de resistencias naturales que forman parte de las características biológicas del microorganismo, la incapacidad del fármaco para ingresar al microorganismo o la presencia de enzimas bacterianas que inactivan al fármaco y la Resistencia Adquirida, que es una consecuencia de los microorganismos genéticamente adaptables que responden a la presión selectiva de los agentes antimicrobianos^{8,9}. Dentro de las bacterias patógenas con alta incidencia en la cavidad bucal, que se han convertido en un problema de salud pública por la resistencia a los antibióticos y dificultar el uso de tratamientos convencionales, se encuentran el *Staphylococcus aureus* resistente a la Meticilina (SARM), *Enterococcus faecalis* responsable de los fracasos e infecciones en endodoncia¹⁰ y *Pseudomonas aeruginosa* considerada factor agravante de la enfermedad periodontal¹¹. Seguido de otro número no menos importante de bacterias exógenas que pudieran comportarse como agentes causales de procesos infecciosos odontológicos tales como *Escherichia coli*, *Klebsiella aerogenes* (*Enterobacter aerogenes*), *Klebsiella pneumoniae*¹⁰⁻¹².

Los mecanismos de resistencia de estas bacterias han evolucionado rápidamente debido a la presencia de presiones selectivas; sus mecanismos de defensa frente a los antibióticos implican la

producción de enzimas que desactivan antibióticos, como las diversas clases de β -lactamasas o enzimas modificadoras de aminoglucósidos, además de cambios en los sitios diana de los antibióticos, ya sea limitando la entrada del antibiótico o facilitando su expulsión¹³. Es reconocido que *Staphylococcus aureus* tiene un notable potencial para desarrollar resistencia a los antibióticos, adquiriendo constantemente nuevos mecanismos lo que le permite ser resistente a los β -lactámicos, tetraciclinas, aminoglucósidos, fluoroquinolonas, clindamicina, trimetoprim-sulfametoxazol, vancomicina, daptomicina y linezolid. Donde, la resistencia a penicilina se relaciona a la producción de penicilinasas (β -lactamasas) y es conferida por una penicilinasas plasmídica, inducible, que inactiva la penicilina G, carboxipenicilinas y ureidopenicilinas o también haciendo inaccesible la entrada de los β -lactámicos a su sitio de acción^{2,3,12}. En el caso de *Enterococcus faecalis* quien se caracteriza por su capacidad de adaptarse a los cambios ambientales severos y una alta patogenicidad; estos microorganismos son completamente resistentes a las cefalosporinas y menos susceptibles a los carbapenémicos. La resistencia intrínseca que posee a los β -lactámicos ocurre por medio de una mutación en proteína fijadora de penicilina (PBP por sus siglas en inglés) que hace que se produzca una baja afinidad a estos antibióticos; la resistencia a los aminoglucósidos se debe a una mutación ribosómica o a la adquisición de elementos genéticos móviles que codifican la síntesis de una pared impermeable a estas moléculas; por otra parte, la resistencia adquirida a la gentamicina está mediada por enzimas que fosforilan y acetilan el antibiótico, haciéndolo incapaz de unirse a la sub unidad ribosomal 30s y la resistencia a la eritromicina de alto nivel es el resultado de un transposón que codifica la resistencia a los macrólidos¹²⁻¹⁵. Por su parte, *Streptococcus mutans* residente de la microbiota bucal y responsable de la formación de la biopelícula dental a través de las enzimas glucosiltransferasas (GTF) y fructosiltransferasas (FTF), puede actuar como “reservas genéticas” y transferir genes de resistencia a las bacterias transitorias de la cavidad bucal, donde se habla de un estado fisiológico de competencia genética que les otorga una capacidad de transformación genética natural que facilita la adquisición de ADN extraño en el ambiente externo^{16,17}.

Dentro del grupo de las bacterias Gram negativas, *Escherichia coli* es una de las de mayor impacto epidemiológico, ya que presenta diferentes mecanismos de resistencia, destacándose la acción de

los inhibidores de β -lactamasas; entre las bases genéticas de adquisición de resistencia se encuentran, la mutación en un gen cromosómico, transposones, integrones y principalmente plásmidos de resistencia, además tienen la capacidad de transferirse epidémicamente de modo horizontal, lo que facilita la adquisición de nuevos factores asociados a su virulencia a partir de otras especies^{12,18}. Por su parte, *Klebsiella aerogenes*, posee una enzima AmpC cromosomal que le confiere una resistencia a las cefalosporinas de primera generación, cuando existe hiperproducción se puede observar resistencia a los β -lactámicos excepto cefepime y carbapenemos; de igual forma, se identifica el mecanismo de bombas de eflujo de la familia RND -Resistencia, Nodulación, como un paso evolutivo frente a la presión de los antibióticos que contribuye a la resistencia intrínseca adquirida y que expresa fenotipos de multiresistencia antibiótica y tolerancia a sustancias biocidas.¹⁹ Cabe destacar que han surgido cepas de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a los carbapenémicos y representan un problema clínico importante, por lo que son particularmente difíciles de manejar ya que albergan AmpC, β -lactamasas en cromosomas.

La expresión de AmpC β -lactamasas puede ocurrir por inducción o, más a menudo, por selección de subpoblaciones hiperproductoras en presencia de ciertos β -lactámicos^{20,21} y por último, *Pseudomonas aeruginosa* presenta una resistencia intrínseca a varios antibióticos lo que limita las opciones terapéuticas, su membrana externa limita la penetración de pequeñas moléculas hidrofílicas y excluye las moléculas más grandes; pequeños antibióticos hidrofílicos como los β -lactámicos y las quinolonas sólo pueden atravesar la membrana externa a través de porinas, sin embargo estas porinas pueden adquirir mutaciones haciéndolas deficientes reduciendo su permeabilidad, modificar los antibióticos o sobreexpresar las bombas de eflujo. Las bombas de eflujo forman un sistema eficiente de expulsión de los antibióticos como β -lactámicos (excepto imipenem), fluoroquinolonas, tetraciclina, macrólidos, cloranfenicol, novobiocina, trimetoprima y sulfonamidas.

Visto este panorama y ubicándonos en la cavidad bucal, con sus características anatómicas, fisiológicas y ecológicas particulares; con una biopelícula compuesta por una comunidad

bacteriana diversa, dentro de una matriz formada por polisacáridos, ADN extracelular, carbohidratos, proteínas y otros componentes bacterianos y un sistema inmunitario del hospedero siempre alerta, que pudieran favorecer el intercambio de mecanismos de resistencia interbacterianos^{12,22}; surge la necesidad de buscar en los productos de origen natural, nuevas moléculas que nos permitan enfrentar la pérdida de efectividad de los antibióticos como elementos controladores de los procesos infecciosos ante el incremento de la resistencia antimicrobiana⁴, así como el diseño de nuevos sistemas que nos permitan colocar tal molécula en el sitio de la infección a fin de minimizar los efectos colaterales de una terapia oral. Actualmente se han preparado una gran variedad de nanocompuestos mediante el uso de diferentes matrices de polímeros y nanorellenos; uno de los biomateriales ampliamente utilizado es el quitosano, un biopolímero lineal compuesto de cadenas distribuidas aleatoriamente de β -(1-4) D-glucosamina y N-acetil- D-glucosamina, obtenido por desacetilación parcial de la quitina, componente estructural de las conchas de crustáceos, exoesqueletos de insectos y pared celular de hongos. El quitosano exhibe características excepcionales, tales como biocompatibilidad y biodegradabilidad, capacidad de esterilizarse por cualquier método, al igual que propiedades antibacterianas, antifúngicas, mucoadhesivas, analgésicas y hemostática. Siendo este un biopolímero que contiene enormes posibilidades estructurales para la modificación química que generan nuevas propiedades importantes para aplicaciones biomédicas²³.

Por otra parte, el Propóleo, que es una sustancia resinosa elaborada por las abejas melíferas (*Apis mellifera*) a partir de los brotes y exudados de ciertas plantas. Una vez colectado, el material es enriquecido con secreciones salivares y enzimáticas, y usado para construir y reparar la colmena. Sin embargo, el propóleo no solo es un material de construcción, sino que también es el “arma química” de las abejas contra los microorganismos patógenos, la presencia de esta sustancia al interior de la colmena proporciona un ambiente inadecuado para el crecimiento de bacterias y otros microorganismos. El propóleo se utiliza desde hace tiempo por sus reconocidas propiedades antibacterianas, antifúngicas, antivirales, antioxidantes, antitumorales y antiinflamatorias²³.

En odontología, son diversas las investigaciones que ponen de manifiesto las propiedades del quitosano y del propóleo de manera individual, obteniendo resultados satisfactorios como tratamiento en cirugías, endodoncias, restauraciones y control periodontal^{24,25}, así como investigaciones han demostrado propiedades químicas y microbiológicas de las membranas de quitosano/propóleo para la regeneración tisular en cavidad bucal y control de microorganismos patógenos de origen odontogénico^{25,26}. No obstante, el estudio antimicrobiano *in vitro* de las combinaciones de propóleo y quitosano sobre bacterias odontopatógenas se ve escaso con respecto a ciertas especies de estudio, siendo un punto de partida para futuras investigaciones y su aplicación en el ámbito clínico odontológico²⁷. Es por esto, que, en el presente estudio, se evaluó la susceptibilidad de bacterias patógenas de interés odontológico a una mezcla de quitosano y propóleo.

MATERIALES Y METODOS

Se desarrolló una investigación explicativa de tipo experimental, en un contexto de laboratorio, a través de pruebas *in vitro*, para establecer la susceptibilidad de siete cepas bacterianas al propóleo contenido en un gel o una membrana de quitosano. Las especies bacterianas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Streptococcus mutans* CVCM 656, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 35218, *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella aerogenes* (aislados clínicos) son pertenecientes al cepario de la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Odontología de la Universidad de Los Andes. Por otra parte, la tintura de propóleo (TP) fue adquirida en la Tienda Apícola ubicada en la calle 21 entre Avenidas 7 y 8. Sector El Espejo de la ciudad de Mérida – Venezuela, de acuerdo a las especificaciones del fabricante se trata de una tintura de propóleo elaborada al 45% p/v de propóleo y el gel de Quitosano al 5% fue elaborado en el Centro de Investigaciones Odontológicas de la Facultad de Odontología de la Universidad de Los Andes (ULA), a partir de 5 gr de quitosano Quitosan®, GUINAMA certificado para uso médico, con 2 mL de ácido acético al 99%.

Se prepararon las membranas de quitosano y propóleo colocando 1 mL del gel de Quitosano al 5% en placas plásticas a la cual se le adicionó el volumen equivalente de tintura de propóleo (Tabla

1), se mezclaron hasta homogeneizar y se colocaron en una estufa de calor seco a 55 °C durante 16 horas. Las membranas fueron removidas manualmente de las placas plásticas, se recortaron en tamaños de 2 mm x 2 mm y se sometieron a esterilización con luz ultravioleta. Por otra parte, se prepararon los geles de quitosano, colocando 1 mL de Quitosano al 5% en tubos de ensayo a los cuales se les adicionó el volumen equivalente de tintura de propóleo según la Tabla 1.

Tabla 1. Volúmenes utilizados para la preparación del gel y las membranas de Propóleo/Quitosano.

Volumen de gel de quitosano 5%	Volumen tintura de propóleo 45%	Concentración final Q/P
1 mL	568 µL	256 µg/mL
1 mL	284 µL	128 µg/mL
1 mL	142 µL	64 µg/mL
1 mL	71 µL	32 µg/mL
1 mL	35,5 µL	16 µg/mL
1 mL	17,75 µL	8 µg/mL

Paralelamente, se realizó la reactivación de los monitores biológicos, inoculando 20 µL de la cepa en tubos de 5 mL caldo tripticasa soya (HiMedia) y se incubaron a 35 °C ± 2 °C por 24 horas. De los cultivos obtenidos se inocularon placas de Agar tripticasa soya (HiMedia) y se incubaron a 35 °C ± 2 °C por 24 horas, concluido el tiempo de incubación se verificó la pureza de cada cepa tanto macroscópica como microscópicamente y, por último, se elaboraron suspensiones bacterianas equivalentes al tubo 0,5 de la escala McFarland en tubos de 5 mL de solución fisiológica salina estéril.

Para la evaluación de la susceptibilidad bacteriana, se inoculó, por triplicado, 180 µL de la suspensión bacteriana 0,5 McFarland de las cepas en estudio, en tubos de 12 mL de agar Müeller-Hinton fundido y temperado a 45 °C, se homogenizó y se vertió sobre las placas que contenían cilindros de acero esteriles, dejando solidificar para luego retirarlos.

Se colocaron los trozos de membrana dentro de los pozos y se humedecieron con 80 µL de saliva artificial para favorecer la difusión de los agentes antibacterianos contenidos en la membrana. En el caso de los geles se dispensaron 80 µL del gel en el pozo correspondiente. Las placas obtenidas

se dejaron reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente y se incubaron a 35 °C en aerobiosis sin invertir durante 6 horas para luego invertirlas e incubarlas a 35 °C, hasta completar las 24 horas (Figura 1). Se utilizó Clohexidina como control positivo y agua destilada como control negativo.



Figura 1. Resultados obtenidos luego de 24 horas de incubación. Notese los halos de inhibición mostrados por el control positivo.

Finalmente se observó el efecto antibacteriano, evidenciando la presencia de halos de inhibición y realizando su medida con ayuda de un vernier, por reverso de las placas.

RESULTADOS

Luego de desarrollar de la parte experimental no se observó la presencia de halos de inhibición en ninguna de las tres placas elaboradas para las bacterias Gram positivas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 y *Streptococcus mutans* CVCV 656; ni para las bacterias Gram negativas *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 35218 y los aislados clínicos *Klebsiella pneumoniae* y *Klebsiella aerogenes* utilizadas como monitores biológicos, tanto para los ensayos para las membranas como para el gel de quitosano y propóleo en sus diferentes concentraciones (256 µg/mL; 128 µg/mL; 64 µg/mL; 32 µg/mL; 16

µg/mL; 8 µg/mL). Solo se observaron halos de inhibición en el caso del agente químico usado como control positivo Clorhexidina al 0,12%.

DISCUSIÓN

Existe una gran variedad de métodos de laboratorio que permiten evaluar la actividad antimicrobiana *in vitro* de un extracto o compuesto puro, para así crear oportunidades para el diseño de nuevos medicamentos para el control microbiano²⁸, siendo la difusión en disco, la difusión de pozos y la dilución en caldo o en agar son de uso común. A través del uso de estas técnicas los investigadores han logrado demostrar las propiedades antibacterianas de numerosos compuestos químicos y biomoléculas presentes en los productos naturales.

Diversos estudios han demostrado la actividad antibacteriana del propóleo y el quitosano bajo diferentes formulaciones²⁹; principalmente sobre bacterias Gram positivas y en menor proporción sobre bacterias Gram negativas es así que, para el propóleo, Uzel *et al.*³⁰, evaluaron la actividad antimicrobiana del propóleo contra los microorganismos *S. sobrinus*, *E. faecalis*, *M. luteus*, *C. albicans*, *S. mutans*, *P. kudriavzevii* (*C. krusei*), *S. aureus*, *S. epidermis*, *K. aerogenes* (*E. aerogenes*) y *P. aeruginosa* utilizando el método de macrodilución, demostraron que la concentración mínima inhibitoria de las muestras de propóleo oscilaron entre 2,0 y 256 mg/ml, siendo efectiva a distintas concentraciones para las distintas cepas estudiadas; Polanco *et al.*³¹, realizaron un estudio con sensidiscos impregnados con: plata coloidal, sangre de drago y propóleo sobre *Proteus* spp., *Klebsiella* spp. y *E. coli*, obtenidas de urocultivos usando como control fosfomicina, determinaron que los tres componentes inhiben el crecimiento de las bacterias, pero menor efectividad que la fosfomicina.

Por otra parte, Nazeri *et al.*³², establecieron la concentración mínima inhibitoria un extracto alcohólico de propóleo, para cuatro especies bacterianas, *S. aureus*, *S. mutans*, *L. acidophilus* y *E. faecalis* mediante dilución en agar, y adicionalmente elaboraron un enjuague bucal de propóleo y se comparó con agua, clorhexidina (CHX) y Listerine utilizando ratas de laboratorio para el

examen clínico; concluyendo que el enjuague bucal de propóleo fue más eficaz contra las bacterias orales estudiadas en comparación con Clorhexidina y Listerine.

En contraposición a los resultados obtenidos en esta investigación, tenemos el estudio de Cedillo *et al.*³³ donde se evidenciaron halos de inhibición para *S. aureus* y *E. faecalis* cuyos halos mostraron una susceptibilidad límite a las 24 horas que varió a susceptibilidad media luego de 48 horas. Luego, Arguto *et al.*²², evaluaron la actividad antimicrobiana del extracto etanólico liofilizado de propóleo, mediante difusión en agar, microdilución colorimétrica y espectrometría de absorción atómica demostrando que los extractos de propóleo presentan actividad antimicrobiana sobre *S. aureus* ATCC 6538 y *P. aeruginosa* ATCC 9027. Cedillo *et al.*³³, determinaron la actividad antibacteriana de Tintura de Propóleo al 45% sobre *S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 29212, *P. aeruginosa* ATCC 27853 y determinaron la CIM utilizando la técnica de macrodilución en tubos, estableciendo una CIM de propóleo de 8 µg/mL para *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 y 128 µg/mL para *Enterococcus faecalis* ATCC 25923 y no presentó efecto antibacterial sobre *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Con respecto al quitosano, Llumiquinga³⁴, analizó las propiedades antibacterianas del quitosano de peso molecular medio y con un grado de desacetilación del 77%, en forma de gel antiséptico para aplicación tópica frente a *E. coli*, *S. aureus* y *P. aeruginosa*, mediante el método de difusión en agar, usando Triclosán como control positivo, se determinó que la concentración de quitosano de 0,1 % y la concentración de gelificante de 0,3 % permitieron la obtención de un gel antiséptico con una alta actividad antibacteriana frente a *S. aureus*, sin embargo, las mismas soluciones de quitosano no presentaron actividad antibacteriana frente a *E. coli* y *P. aeruginosa*, resultados que coinciden parcialmente con los obtenidos en esta investigación al no mostrar efecto contra bacterias Gram negativas; Wang *et al.*³⁵, evaluaron el efecto del quitosano y el cloruro de quitosano de N-(2-hidroxilo) propil-3-trimetilamonio (HTCC) sobre *E. faecalis* asociado con la infección endodóntica demostrando un efecto antibacteriano significativo en la biopelícula de *E. faecalis* a través de la interacción de carga, en contraposición a los resultados obtenidos para las bacterias Gram negativas evaluadas en este trabajo.

Por su parte, Antunes *et al.*³⁶ prepararon películas de quitosano (CS) y aceites esenciales que contenían eugenol (PVA) proporción 30/70 p/p; 9% en peso por el método de inversión de fase y colada en disolvente sobre cepas de *S. aureus* y *P. aeruginosa*; Las películas de CS por sí solas fueron eficaces contra *S. aureus* y *P. aeruginosa* y capaces de erradicar a *P. aeruginosa* dentro de la hora. Aun así, las películas CS/PVA cargadas mostraron rasgos significativamente mejorados en relación con las películas descargadas dentro de las 2 h del contacto; Ruíz³⁷ 2020, evaluó un hidrogel de quitosano/extracto etanólico *Rumex obtusifolius* la cual posee actividad antiadhesiva contra *S. mutans* CDBB-B-1455 a los 20 y 60 minutos en medio de cultivo Mitis Salivarius y Sacarosa y Fosfato.

López *et al.*³⁸ estudiaron la identificación y sensibilidad antibiótica de los microorganismos *P. mirabilis*, *E. coli*, *K. aerogenes* (*E. aerogenes*), *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* y *M. morgani* se determinó en microplacas, y se desarrollaron pruebas *in vitro* por la técnica de difusión en agar. Todas las membranas mostraron efectos antimicrobianos por contacto directo. Es importante destacar que Cedillo *et al.*³³ en estudios previos realizados en la Facultad de Odontología ULA no lograron mostrar efecto inhibitor del gel de quitosano sobre *S. aureus* ATCC 25923, *E. faecalis* ATCC 29212, *P. aeruginosa* ATCC 27853. Lo que permite demostrar que el gel de quitosano preparado en la facultad de Odontología ULA no posee actividad antibacteriana sobre las bacterias en estudio, situación que puede estar relacionada con el proceso y tiempo de elaboración, los ingredientes utilizados, entre otros factores, pero lo hace un buen vehículo para la incorporación de moléculas bioactivas y la evaluación de su actividad antibacteriana.

Uno de los grandes retos de la industria farmacéutica está relacionado al diseño de Fármacos. La brecha entre los hallazgos y pruebas *in vitro* tanto químicas como bioquímicas; y la incorporación en un vehículo apropiado, inerte, amigable, rentable entre otras características plantea un proceso de pruebas de ensayo y error que conducen a la estandarización proceso de producción en masa. Sobre la base de la afirmación anterior, diversos estudios afirman la utilidad del quitosano como vehículo de biomoléculas³⁹, en este estudio, se elaboraron geles y membranas de quitosano con las concentraciones establecidas y se evaluaron *in vitro* a través de pruebas microbiológicas, los

resultados arrojados por estas pruebas mostraron que no hubo actividad antimicrobiana por las membranas en ninguna de sus concentraciones. Mismo caso que obtuvo León *et al.*⁴⁰, donde probaron la actividad antimicrobiana de membranas de quitosano-alcohol polivinílico y extracto etanólico de propóleo sobre cepas de *S. aureus* y *P. aeruginosa*, donde no hallaron halos inhibitorios creados por las membranas.

En contraposición, Luaces⁴¹, fabricó un gel de quitosano y extracto etanólico de propóleo en una única concentración el cual probó microbiológicamente contra cepas de *S. aureus* y *E. faecalis* por el medio de difusión de Kirby-Bauer, donde obtuvo halos inhibitorios para ambas bacterias con un diámetro que variaba entre 21 – 30 mm, siendo estos resultados contradictorios con los obtenidos en el presente trabajo.

Ong *et al.*⁴² investigaron la acción antimicrobiana y propiedades antibiopelícula contra *E. faecalis* de una nanoformulación de quitosano-propóleo en base a condiciones fisicoquímicas ideales. Esta formulación inhibió la formación de biopelícula y redujo el número de bacterias en la biopelícula en 90 % a una concentración de 200 µg/ml. Cuando se probó en biopelículas preformadas, la formulación redujo la contaminación bacteriana en la biopelícula en 40% y 75% a 200 y 300 µg/ml, respectivamente; no solo redujo el número de bacterias, sino que también alteró físicamente la estructura del biopelícula. El-Sheikh *et al.*²⁵ sintetizaron nanopartículas de quitosano y nanocompuestos de quitosano-propóleo y demostraron la actividad del nanocompuesto de quitosano/propóleo a una CMI 0,5 µg/ml contra *S. aureus*, 2 µg/ml contra *E. coli* y 4 µg/ml contra *Salmonella*.

En un estudio similar realizado por Cedillo *et al.*³³, quienes elaboraron membranas de quitosano/propóleo con la CIM obtenidas previamente y evaluaron el efecto antimicrobiano mediante método de difusión en agar utilizando como grupo control gluconato de clorhexidina al 0,12% no se alcanzó evidenciar la presencia de actividad antibacteriana sobre las bacterias estudiadas, en las concentraciones ensayadas, en concordancia a los resultados obtenidos en el presente trabajo. Tales resultados permiten inferir que las moléculas bioactivas del propóleo, por una parte, se quedan atrapadas dentro de la malla de quitosano y no pueden difundir en el agar o que la técnica de difusión en el agar no provee las condiciones necesarias para favorecer la difusión

de la molécula de la membrana al agar. De allí la importancia de probar nuevas técnicas de elaboración del gel de quitosano, así como otras técnicas microbiológicas y biológicas que permitan evidenciar el efecto antibacterial demostrado en otros estudios.

CONCLUSIONES.

No se logró evidenciar efecto antimicrobiano sobre las bacterias estudiadas, mediante las técnicas microbiológicas desarrolladas, tanto para los ensayos para las membranas, como para el gel de quitosano y propóleo en sus diferentes concentraciones. Tales resultados sugieren la evaluación de otros métodos *in vitro* para demostrar la presencia de actividad antibacteriana del propóleo, referenciada por otros autores, así como el estudio del efecto *in vivo* de las membranas y el gel sobre heridas quirúrgicas en animales de experimentación.

AGRADECIMIENTOS

A ProBioVital C.A., por abrir las puertas de su sede y equipos para el desarrollo experimental de esta investigación.

REFERENCIAS

1. Rodríguez E, Rodríguez M. Tratamiento antibiótico de la infección odontogénica. *Inf. Ter. Sist. Nac. Salud.* 2009. 33:3 67-79. Disponible en: https://www.sanidad.gob.es/biblioPublic/publicaciones/recursos_propios/infMedic/docs/vol33_3TratAntibInfecOdont.pdf
2. Luján D. *Pseudomonas aeruginosa*: un adversario peligroso. *Acta Bioquim. Clin. Latinoamérica.* 2014. 48(4). Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/535/53535594009.pdf>
3. El-Guendouz S, Aazza S, Lyussi B, Bankova V, Popova M, Neto L, Faleiro M, Graca M. Moroccan Propolis: A natural antioxidant, antibacterial, and antibiofilm against *Staphylococcus aureus* with no induction of resistance after continues exposure. *Evid. Based Complement Alternat. Med.* 2018. 20 (12). Disponible en: <https://www.hindawi.com/journals/ecam/2018/9759240/>.
4. Moya E. Susceptibilidad de *Enterococcus faecalis* ATTC-29212 frente a la combinación de dos extractos naturales con hidróxido de calcio [tesis de grado: odontología]. Riobamba

- Ecuador. Universidad Nacional de Chimborazo. 2021. Disponible en: https://rraae.cedia.edu.ec/Record/UNACH_bec4bbb07703f09a4176b7cf0a941341.
5. Medina J, Álvarez I, Toxiqui-Tlachino M, Román B. Percepción d la resistencia bacteriana a antibióticos por el uso prolongado de antibióticos y automedicación en la población en general. Trabajo presentado en: XVI Coloquio Panamericano de Investigación en Enfermería. Cuba. 2018. Disponible en: <https://coloquioenfermeria2018.sld.cu/index.php/coloquio/2018/paper/viewPaper/1207>.
 6. Fajardo A, Méndez F, Hernández J, Molina L, Milena A, Nossa C, Tejeiro J, Ramírez N. La automedicación de antibióticos: un problema de salud pública. Salud Urinorte. 2013. 29(2).226-235. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-55522013000200008&lng=en.
 7. Bisso-Andrade A. Resistencia a los antibacterianos. Rev Soc Peru MED Interna. 2018. 31(2): 50-59. Disponible en: <http://51.79.48.69/index.php/spmi/article/view/32/31>.
 8. Olalla A. Revisión Bibliográfica: Bacterias multirresistentes [tesis de grado: Biología]. Repositorio Universidad de Coruña. La Coruña, España. 2021. Disponible en: <https://ruc.udc.es/dspace/handle/2183/29265>.
 9. Castellano M, Perozo-Mena A. Mecanismos de resistencia a antibióticos β -lactámicos en *Staphylococcus aureus*. Kasmera. 2010. 38(1). 18-35.
 10. Fulano C, Serrato J. Frecuencia de *Staphylococcus aureus* meticilino resistente y *Enterococcus faecalis* en cavidad bucal de pacientes que acuden a la consulta de endodoncia [Tesis de grado: Bacteriología]. Bogotá. Pontificia Universidad Javeriana. 2011. Disponible en: <https://repository.javeriana.edu.co/handle/10554/8889>.
 11. Invernizzi-Mendoza CR, Corbeta H. Frecuencia de *Pseudomonas aeruginosa* en bolsas periodontales de pacientes con Periodontitis Crónica. Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud [Internet]. 23 de diciembre de 2020 [citado 12 de mayo de 2022];18(3):73-8. Disponible en: <https://revistascientificas.una.py/index.php/RIIC/article/view/516>.
 12. Gutiérrez N, Romero C, Yañes F. Estudio dela presencia de *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* y *Candida albicans* en los núcleos elaborados en la clínica odontológica de la Universidad Cooperativa de Colombia sede Villavicencio [Tesis de grado: Odontología]. Colombia. Universidad Cooperativa de Colombia. 2016. Disponible en: <https://repository.ucc.edu.co/handle/20.500.12494/4825>.
 13. Kakoullis L, Papachristodoulou E, Chra P, Pano G. Mechanisms of antibiotic resistance in important Gram-positive and Gram-negative pathogens and novel antibiotic solutions. MDPI. 2021. 10(4): 415. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33920199/>
 14. Raza T, Rahmat S, Mehmood K, Andleeb S. Vancomycin resistant Enterococci: a brief review. JPMA. 2018. 68(5): 768- 772. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29885179/>.
 15. Mantilla J. Comparación del efecto antibacteriano de un extracto etanólico de Propóleo a dos concentraciones y del Paramonoclorofenol Alcanforado frente a *Enterococcus faecalis* y *Fusobacterium nucleatus*. BSL. 2019. 7(1): 53-65. Disponible en: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-1005802>.

16. Parolia A, Kumar H, Ramamurthy S Madheswaran T, Davamani F, Rao M, Mak K, Fawzy A, Daood U, Pau A. Effect of propolis nanoparticles against *Enterococcus faecalis* biofilm in the root canal. *Molecules*. 2021. 26(3). Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33573147/>.
17. Barrientos S, Serna F, Díez H, Rodríguez A. Resistencia a la amoxicilina de cepas de *Streptococcus mutans* aisladas de individuos con antibioticoterapia previa y sin esta. *Univ. Odontol*. 2015. 34(72): 101-106.
18. Veliz V, Mija J. Efecto antibacteriano del extracto etanólico de *Echinopsis pachanoi* (San Pedro) sobre *Streptococcus mutans* ATCC 25175 y *Escherichia coli* ATCC 25922 [Tesis de grado: Químico Farmacéutico]. Huancayo Perú. Universidad Privada de Huancayo “Franklin Roosevelt”. 2021. Disponible en: <http://repositorio.uoosevelt.edu.pe/handle/ROOSEVELT/669>.
19. Mármol M, Guerrero D, Burbano E, Iburguen E. Modelado matemático de adquisición de resistencia bacteriana vía plasmídica de una población de *Salmonella entérica* sensible en presencia de *Escherichia coli* resistente. *Inf. Tecnol*. 2021. 32(5): 91-100. Disponible en: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?pid=S0718-07642021000500091&script=sci_arttext.
20. Zanguña Luisa, Torres M, Di Filippo G. Perfil de tolerancia al triclosán y detección de los genes MexA, MexC, AcrB y oqxA relacionados con la expresión de bomba de expulsión en aislados clínicos del género *Enterobacter aerogenes* y *Enterobacter cloacae*. *Inf. Tecnol*. 2020. 7(1): 102-117. Disponible en: <https://revistasdigitales.uniboyaca.edu.co/index.php/rs/article/view/400>.
21. Custodio M, Sánchez D, Anderson B, Ryan K, Walraven C, Claude R. Emergence of resistanse in *Klebsiella aerogenes* to Piperacillin-Tazobactam and Ceftriaxone. *American Society for Microbiology*. 2021 25(2). Disponible en: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/aac.01038-20?permanently=true>.
22. Lim T, Qi-Min J, Wei-Ling A, Tan S, Koh T, Hui-Ling W, Cai Y, Tan T, Lay-Hoon A. In vitro pharmacodynamics of Fosfomycin against Carbapenem-Resistant *Enterobacter cloacae* and *Klebsiella aerogenes*. *ASM Journals*. 2020. 65(2). Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32571821/>.
23. Agurto J, Cuya E. Actividad antimicrobiana del extracto etanólico liofilizado de propóleo procedente de Ayacucho y Huaral frente a *Staphylococcus aureus* y *Pseudomona aeruginosa* [Tesis de grado: Químico Farmacéutico]. Lima, Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 2021. Disponible en: <https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/16527>.
24. Arias-Andrade Y, Veloza L, Sepúlveda-Arias J. Nanocompuestos de quitosano aplicados al campo de la medicina regenerativa. Una revisión sistemática. *Sci. Tec*. 2020. 25(4): 604-615. Disponible en: <https://revistas.utp.edu.co/index.php/revistaciencia/article/view/23411/16450>.
25. Leo M, Martínez L, Rincón F, Ortiz R. Propiedades químicas y microbiológicas de membranas de quitosano/propóleo con utilidad para regeneración tisular en cavidad bucal. *Acta Bioclínica*. 2021. 11(22). Disponible en: <http://revistas.saber.ula.ve/>.
26. El-Sheikh S, El-Alim A, Ibrahim E, Mobarez E, Masry D, El-Sayed W. Preparation, characterization and antibacterial activity of chitosan nanoparticle and Chitosan-propolis

- Nanocomposite. *Avd. Anim. Vet. Sci.* 2019. 7(2): 183-190. Disponible en: https://nexusacademicpublishers.com/uploads/files/AAVS_7_s2_183-190.pdf.
27. Serra M. La Resistencia microbiana en el context actual y la importancia del conocimiento y aplicación de la política antimicrobiana. *Rev. Habanera de Cienc. Médicas.* 2017. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1729-519X2017000300011.
28. Montero M, Vayas L, Avilés D, Pazmiño P, Gutiérrez V. Evaluación de dos métodos para medir la sensibilidad de inhibición de crecimiento de la cepa certificada de *Staphylococcus aureus spp.* *Aureus. Rev. Inv. Vet Perú.* 2018. 29(4): 1543-1547. Disponible en: <http://www.scielo.org.pe/pdf/rivep/v29n4/a52v29n4.pdf>.
29. Rivas C, Oranday M, Verde M. Investigación en plantas de importancia médica. 6ta ed. JOTSE. Mexico: 2016. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/316860979_investigacion_en_plantas_de_importancia_medica.
30. Uzel A, Sorkun K, Oncag O, Cogulu D, Gencay O, Sali'h B. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis sample. *Microbiological Research.* 2005. 160(2): 189-195. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S094450130500011X>.
31. Polanco J, Odonel H. Efectividad in vitro de los componentes Plata Coloidal, propóleo y Sangre de Drago frente a la fosfomicina sobre bacterias Gram-negativas causantes de infecciones del tracto urinario en el humano [Tesis de grado: Medicina]. Universidad San Carlos de Guatemala. Guatemala. 2018. Disponible en: <http://www.repositorio.usac.edu.gt/9928/>.
32. Nazeri R, Ghaiour M, Abbasi S. Evaluation of antibacterial effect of Propolis and its application in Mouthwash production. *Front Dent.* 2019. 16(1): 1-12. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6778618/>.
33. Cedillo I, Fernández Y. Efecto antimicrobiano de membranas de quitosano y propóleo sobre bacterias patógenas de interés odontológico [Tesis de grado: Odontología]. Mérida, Venezuela. Universidad de Los Andes. 2021.
34. Llumiyinga O. Determinación de la actividad antibacteriana del quitosano para su aplicación en geles antisépticos de uso tópico [Tesis de grado: Químico Farmacéutico]. Universidad Central de Ecuador. Quito, Ecuador. 2018. Disponible en: <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/16161>.
35. Wang N, Ji Y, Zhu Y, Wu X, Mei L, Zhang H, Deng J, Wang S. Antibacterial effect of chitosan and its derivative on *Enterococcus faecalis* associated with endodontic infection. *Experimental and Therapeutic Medicine.* 2020. 19(6): 3805-3813. Disponible en: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/etm.2020.8656>.
36. Antunes J, Tavares T, Teixeira M, Homem N, Amorin M, Felgueiras H. Eugenol-Containing essential oils loaded onto Chitosan/Polyvinyl alcohol blended films and their ability to eradicate *Staphylococcus aureus* or *Pseudomonas aeruginosa* from infected microenvironments. *Pharmaceutics.* 2021. 13(2): 195. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33540524/>.

37. Ruiz M. Actividad anti adhesiva in vitro de Hidrogel de Quitosano/Rumex obtusifolius contra *Streptococcus mutans* en órganos primarios [Tesis de grado: Maestría en Pediatría]. Benemérita Universidad de Puebla. Puebla. 2020. Disponible en: <https://repositorioinstitucional.buap.mx/handle/20.500.12371/10057>.
38. Lopez J, Escárcega A, Sánchez D, Ramirez B, Valenzuela R, Campas O, Cantú E, Mendivil C. Effect of chitosan membranes against gram-negative bacteria isolated from cutaneous ulcers. Nova Biotecnol. Chim. 2021. 21(1). Disponible en: <https://journals.scicell.org/index.php/NBC/article/view/806>.
39. Hossain A, Roy S, Guin PS. The Importance of advance biomaterials in modern technology: a review. J Asian Nat Prod Res [Internet]. 2017;10 (4):441-53. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/318897063_The_Importance_of_Advance_Biomaterials_in_Modern_Technology_A_Review.
40. León K, Santiago J. Actividad antimicrobiana de propóleo en solución etanólica y en películas de quitosano-alcohol polivinílico. Inst Peru Energía Nucl [Internet]. 2008;7:207-10. Disponible en: http://dspace.ipen.gob.pe/bitstream/ipen/567/1/Pag_207-210_ICT-2007.pdf.
41. Luaces G. “Actividad antimicrobiana in vitro del quitosano/propóleo en gel sobre el *Enterococcus faecalis*”. [Tesis de grado: Especialidad en Endodoncia]. Ecuador: Universidad de Cuenca; 2017. Disponible en: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/28167>.
42. Ong T, Chitra E, Ramamurthy S, Paruvathanahalli R, Yuen K, Periathamby S, Davamani F. Chitosan-Propolis nanoparticle formulation demonstrates anti-bacterial activity against *Enterococcus faecalis* biofilm. PLOS One. 2017. 12(3). Disponible en: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0174888>.