

Efecto antibacteriano del extracto etanólico de *Camellia sinensis* y propóleo, frente a cepas de *Streptococcus mutans*

Antibacterial effect of the ethanolic extract of *Camellia sinensis* and propolis, against strains of *Streptococcus mutans*

Johana Liseth Acosta Asanza ^{1, a} Ana del Carmen Armas Vega ^{1, b}

¹ Universidad Central del Ecuador, Facultad de Odontología, Quito, Ecuador.

^a Odontóloga General.

^b Doctora en Operatoria Dental.

Correspondencia:

Johana Liseth Acosta Asanza: jlasanza@uce.edu.ec
Av. Guillermo Garzón Ubidia, s/n. Barrio Santiaguillo.
Otavalo. Ecuador. CP:100207
ORCID: 0000-0002-4775-0605

Coautora:

Ana del Carmen Armas Vega: acarmas@uce.edu.ec
ORCID: 0000-0003-3800-8166

Editor:

Donald Ramos-Perfecto
Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú.

Conflicto de intereses: los autores declaran no tener conflictos de interés.

Fuentes de financiamiento: autofinanciado.

Recibido: 06/10/21

Aceptado: 09/02/22

Publicado: 11/04/22

Resumen

Objetivo. Determinar el efecto antibacteriano del extracto etanólico del té verde (*Camellia sinensis*) y propóleo a una concentración de 10, 20 y 30% a las 24 y 48 horas sobre *Streptococcus mutans*. **Métodos.** Estudio experimental, in vitro, comparativo, con muestra no probabilística de 150 discos de papel, distribuidos en 30 placas Petri previamente preparadas con agar sangre e inoculadas con cepas de *Streptococcus mutans*, se colocaron tres discos embebidos en extracto etanólico al 10, 20 y 30%, un disco en clorhexidina 0,12% (control positivo) y un disco en agua destilada, fueron llevadas a la incubadora y pasadas las 24 horas y 48 horas se midieron los correspondientes halos de inhibición. Los extractos se obtuvieron mediante un proceso de maceración modificado, en aparato de agitación rotatorio. **Resultados.** El mayor halo inhibitorio del extracto etanólico de *Camellia sinensis* (*C. sinensis*) frente a *Streptococcus mutans* fue en la concentración al 30% a las 24 h y 48 h, mientras que el mayor halo inhibitorio del extracto etanólico de propóleo, fue en la concentración al 30% a las 24 h, por lo tanto, los extractos naturales mostraron ser sensibles en la escala de Duraffour. **Conclusiones.** Se evidenció que el propóleo al 30% mostró un efecto antibacteriano similar a la clorhexidina, considerada gold estándar, el tiempo en el que existió mayor efecto antibacteriano del extracto etanólico de *C. sinensis* y propóleo frente a *Streptococcus mutans*, fue a las 24 horas, el diámetro de los halos inhibitorios disminuyó, conforme aumentó el tiempo de exposición al microorganismo.

Palabras clave: Antibacteriano; Própolis; *Camellia sinensis*; Clorhexidina; *Streptococcus mutans* (fuente: DeCS BIREME).

Abstract

Objective. To determine the antibacterial effect of the ethanolic extract of green tea (*Camellia sinensis*) and propolis at a concentration of 10, 20 and 30% at 24 and 48 hours on *Streptococcus mutans*. **Methods.** Experimental, in vitro, comparative study, with a non-probabilistic sample of 150 paper discs, distributed in 30 Petri dishes previously prepared with blood agar and inoculated with strains of *Streptococcus mutans*, were placed 3 discs soaked in ethanolic extract at 10, 20 and 30%, 1 disk in 0.12% chlorhexidine

(positive control) and 1 disk in distilled water, they were taken to the incubator and after 24 hours and 48 hours the measurements corresponding to the inhibition halos were made. The extracts were gotten by a modified maceration process, in a rotary stirring apparatus. **Results.** The highest inhibitory halo of the ethanolic extract of *C. sinensis* against *Streptococcus mutans* was in the concentration at 30% at 24 h and 48 h, while the highest inhibitory halo of the ethanolic extract of propolis, was in the concentration at 30% at 24 h; therefore, the natural extracts showed to be sensitive on the Duraffourd scale. **Conclusions.** It was evidenced that 30% propolis showed an antibacterial effect similar to chlorhexidine, considered gold standard, the time in which there was a greater antibacterial effect of the ethanolic extract of *Camellia Sinensis* and propolis against *Streptococcus mutans*, was at 24 hours, taking into account that the diameter of the inhibitory halos decreased, as the exposure time to the microorganism increased.

Keywords: Antibacterial; Propolis; *Camellia sinensis*; Chlorhexidine; *Streptococcus mutans* (source: MeSH NLM).

Introducción

La caries dental es considerada un problema de salud pública a nivel mundial, afecta a personas de todas las edades, es decir del 80% al 90% de la población, siendo el primer problema de salud oral debido a su alta prevalencia, según la Organización Panamericana de la Salud ¹. Es un proceso multifactorial que progresa lentamente a causa de los microorganismos presentes en cavidad oral, específicamente en el biofilm dental; además con una dieta alta en azúcares y sumado a esto mala higiene bucal, déficit de fluoruro y anomalías en la estructura del esmalte, factores que modifican el pH de la cavidad oral, pasando de un pH neutro a un pH ácido, lo que ocasiona la desmineralización de la pieza dental ².

La cavidad bucal debido a su estructura, temperatura y niveles de oxígeno, es el hábitat perfecto para un gran número de microorganismos, son más de 700 especies microbianas las que forman parte de la microbiota normal presente en boca, especies encargadas de mantener un equilibrio en el estado de salud bucal ³. Cuando existe un desequilibrio en la microbiota bucal debido a los factores mencionados anteriormente, los primeros colonizadores son bacterias anaerobias facultativas, como es el caso del *Streptococcus mutans* (*S. mutans*), debido a su capacidad para sobrevivir en presencia o ausencia de oxígeno, sin embargo, en anaerobiosis se produce un crecimiento óptimo; coco Gram positivo, productor de ácido láctico, convirtiendo un pH neutro en un pH ácido y como consecuencia la desmineralización de las estructuras duras del diente ⁴. Denominado *S. mutans*, debido a las formas mutantes que toma dependiendo el medio, es decir, en un medio ácido toma la forma de un coco bacilo, forma ovalada y en un medio alcalino toma la forma de un coco, forma redonda ⁵. Es posible cultivar esta bacteria en agar sangre y las colonias que se forman tienen un diámetro de 0,5 a 1 mm, son altas, convexas, pulvinadas o en forma de cojín, opacas y tienen un aspecto de vidrio esmerilado ⁶.

Buscando detener el proceso carioso y la consecuente formación de lesiones cariosas, se han empleado sustancias químicas como la clorhexidina e incluso antibióticos como la penicilina, cuyos efectos secundarios se

ligaron a la tinción, disgeusia e inclusive resistencia a los antibióticos ⁷, por lo que se ha incrementado el estudio de productos naturales que realicen la misma acción, sin efectos secundarios nocivos a la salud de los individuos ⁸; en ese contexto productos como el propóleo y té verde por contener polifenoles y terpenoides, compuestos químicos relacionados con el efecto bactericida y bacteriostático, han demostrado inhibir la formación del biofilm dental, minimizando la adhesión bacteriana específicamente del *S. mutans* microorganismo responsable de la formación de la caries dental ⁹, junto con la remoción manual del biofilm dental con instrumental odontológico y una adecuada técnica de cepillado dental diario, por lo que las sustancias químicas y productos naturales deben ser usados como complemento, pero no como reemplazo ³.

Estudios mencionan los efectos de extractos naturales sobre ciertos microorganismos, con base a la inhibición de la biopelícula, la responsable de la formación de placa bacteriana y caries dental, el éxito reportado ha desencadenado gran interés en odontología por el efecto antibacteriano ligado a componentes como los terpenos y flavonoides ⁹. La literatura reporta diferentes estudios con productos naturales a base de plantas, analizando una concentración eficaz que genere un efecto similar al de la clorhexidina al 0,12%, ya que han concluido que es difícil obtener extractos en concentraciones altas, por lo que aún existe controversia sobre las concentraciones adecuadas ¹⁰.

El propóleo, sustancia resinosa de origen vegetal elaborada por abejas al obtener la resina de ciertas plantas y luego de ser digerida parcialmente es mezclada con polen y cera ¹¹, posee actividad antimicrobiana, antiinflamatoria, cicatrizante, anestésica, anticancerígena y antioxidante, por lo que es muy utilizado en el área de la salud ¹², en odontología es usado en abscesos, enfermedad periodontal y para prevenir caries ⁸. Su composición química se encuentra asociada a la presencia de resinas y bálsamos aromáticos, aceites esenciales, ceras, polen, flavonoides, ácidos orgánicos, ácidos fenoles, aldehídos aromáticos, cumarina, ácidos grasos, minerales y vitaminas ¹³, la actividad antibacteriana se le atribuye

especialmente a los flavonoides y ácidos fenólicos al inhibir la división celular, interrumpir el ADN, desorganizar la membrana citoplasmática e inhibir la síntesis de la pared celular, lo que provoca bacteriólisis parcial e inhibe la síntesis proteica, además que interrumpe la formación del biofilm dental, factor importante para evitar la caries ¹⁴.

Un estudio previo realizado con extracto etanólico de propóleo peruano proveniente del Valle de Oxapamba-Pasco, en concentraciones al 0,8, 20 y 30%, muestra que el mayor efecto antibacteriano frente a *S. mutans* se dio con el extracto en concentración al 0,8% ¹⁵. En otro estudio con extracto etanólico de propóleo peruano en concentraciones al 25, 50 y 75%, se determinó que todas las concentraciones generaron efecto antibacteriano frente a *S. mutans*, sin embargo, los valores del extracto etanólico de propóleo fueron menores (25% = 17,5 ± 2,5 mm) que los de la clorhexidina (0,12% = 24,5 ± 2,4 mm) ¹². En una investigación en la que se evaluó el efecto inhibitorio de tres dentífricos a base de propóleo frente a distintos patógenos orales, incluido *S. mutans*, se empleó como control positivo clorhexidina al 0,2% y extracto de propóleo al 11%, obteniendo como resultado halos en promedio, Noplak Max = 9,0 ± 1,0; Protta = 28,3 ± 0,6; Forever Bright = 24,8 ± 4,0; Clorhexidina = 19,3 ± 2,1 y Extracto de propóleo = 14,0 ± 1,0 ¹⁶.

Té verde, proveniente de la planta *C. sinensis*, pertenece a la familia *Theaceae*, planta originaria de zonas tropicales de India y China, se recolectan las hojas cuando la planta tiene 3 años, su máximo rendimiento se da a los 10 años y está recolección puede llevarse a cabo durante 25-50 años ¹⁷, en su composición la presencia de bases xánticas, polifenoles, catequinas y minerales, contiene mayor cantidad de polifenoles (30% - 40%) que el té negro (3%-10%) proporcionando mayor acción antiinflamatoria, antibacteriana, antiviral, antioxidante; mejorando la salud bucal, al disminuir la posibilidad de presentar enfermedades cardiovasculares, regular la cantidad de glucosa en sangre ¹⁸, previniendo enfermedades periodontales, caries, halitosis, además que ayuda a prevenir la inflamación de la mucosa debido al humo del cigarrillo; él té verde al ser rico en flúor y catequinas inhibe el crecimiento de bacterias cariogénicas, evitando que el *S. mutans* se adhiera a la superficie dental y se forme el biofilm y a la par ayuda a remineralizar el esmalte ¹⁹.

Una investigación realizada con extracto etanólico de té verde en distintas concentraciones, muestra que la mínima concentración inhibitoria frente a *S. mutans* fue al 0,2% y la mínima concentración bactericida frente a *S. mutans* fue al 0,8% generando halos inhibitorios de 18,3 mm, concluyendo que existe efecto antibacteriano ²⁰. En el 2020, un estudio en el que se empleó extracto etanólico de té verde en concentraciones al 10 y 20% frente a *S. mutans*, demostró que el máximo ancho de halo inhibitorio fue a las 24h, en la concentración al 10%, con un promedio de 5,6 mm ± 0,5 mm y en la concentración al 20% fue de 6,8 mm ± 0,9 mm, concluyendo que el extracto etanólico de té verde genera menor efecto antibacteriano que el propóleo ¹⁰.

Al no existir suficientes datos sobre las concentraciones adecuadas para inhibir el *S. mutans*, ni el tiempo de incubación adecuado que desencadene resultados, por esta razón el objetivo del presente estudio es determinar el efecto antibacteriano del extracto etanólico de té verde (*C. Sinensis*) y propóleo al 10, 20, 30% a las 24 y 48 horas sobre *S. mutans* y compararlo con el efecto antibacteriano del gluconato de clorhexidina al 0,12%, que fue el control positivo, mediante estudio microbiológico.

Métodos

Se ejecutó un estudio de tipo experimental in vitro, comparativo al analizar el efecto antibacteriano del té verde y propóleo en tres concentraciones distintas sobre *S. mutans*, empleando como comparación de sustancia *gold estándar* a la clorhexidina al 0,12%, realizándose la evaluación en dos periodos de tiempo, 24 y 48 horas. La cepa de *S. mutans* ATCC 25175 fue adquirida en el laboratorio MEDIBAC-Quito, quienes son importadores y distribuidores autorizados de la empresa "Microbiologics INC." Minnesota-USA y fue almacenada y conservada en un refrigerador a una temperatura de 4±2oC en el Laboratorio Clínico y Bacteriológico de la Facultad de Ciencias Químicas.

El estudio constó con una muestra no probabilística, por conveniencia, tomando en cuenta el tamaño de muestra y la metodología aplicada previamente ¹⁰, seleccionada por ser considerada confiable y sensible, donde se utilizó un total de 150 discos de papel, distribuidos en 30 placas Petri previamente preparadas con agar sangre, en las que se inoculó *S. mutans*, medio de cultivo óptimo para su crecimiento por la facilidad para identificar las colonias de este microorganismo ⁶, la distribución de los discos de papel fue de la siguiente manera, en 15 placas Petri se colocó un total de cinco discos por caja, de los cuales tres discos estuvieron embebidos en extracto de *C. sinensis* en concentraciones al 10, 20 y 30%, un disco embebido en clorhexidina al 0,12% (control positivo) y un disco embebido en agua destilada (control negativo) y en las restantes 15 placas Petri se colocó un total de 5 discos por caja, de los cuales tres discos estuvieron embebidos en extracto de propóleo en concentraciones al 10, 20 y 30%, un disco embebido en clorhexidina al 0,12% (control positivo) y 1 disco embebido en agua destilada (control negativo)

Obtención del extracto etanólico de té verde (*C. Sinensis*). 30 gramos de hojas de té verde adquiridas de manera comercial, fueron pesadas en una balanza semianalítica, se introdujo en un envase PET blanco junto con 100 mL de etanol al 75%, el cual fue colocado en el equipo de agitación rotatorio durante 48 horas, pasado este tiempo se procede a filtrar el extracto, este procedimiento se repite dos veces más para obtener extracto puro, una vez obtenido el extracto puro se procede a eliminar el solvente para obtener las concentraciones requeridas, para lo cual se evapora una parte del solvente a una temperatura de aproximadamente 45°C en una estufa de temperatura controlada hasta obtener el extracto al 30% de concentración. Para obtener el extracto en

una concentración al 20% se tomó 6,6 mL de extracto puro y se adicionó 3,4 mL de solución de etanol al 75%, para la concentración al 10% se tomó 3,3 mL de extracto puro y se adicionó 6,7 mL de solución de etanol al 75%. Los extractos etanólicos obtenidos en concentraciones al 10, 20 y 30% fueron esterilizados en cámara UV por 30 minutos.

Obtención del extracto etanólico de propóleo. Se pesó 10 gramos de propóleo puro (mucilago), el cual se introdujo en un frasco limpio y seco de capacidad de 250 mL, se añadió al frasco 50 mL de una solución de etanol al 75% y el frasco se colocó en el equipo de agitación rotatorio por 48 horas, pasado este tiempo se retiró el frasco y se filtró la solución obtenida, este proceso se realiza de la misma manera dos veces más, la solución obtenida luego de las 3 extracciones, es extracto de propóleo en una concentración al 30%. Para obtener el extracto etanólico de propóleo en una concentración al 20% se tomó 6,6 mL del extracto al 30% y se adicionó 3,4 mL de solución de etanol al 75% y para la concentración al 10% se tomó 3,3 mL del extracto al 30% y se adicionó 6,7 mL de solución de etanol al 75%. Los extractos etanólicos obtenidos en concentraciones al 10, 20 y 30% fueron esterilizados en cámara UV por 30 minutos.

Las placas Petri fueron rotuladas con anticipación, todo el procedimiento de siembra y colocación de discos se realizó en la cámara de flujo laminar, se procedió a sembrar la bacteria en agar sangre mediante técnica de hisopado, para lo cual se utilizó un hisopo estéril, sumergiéndolo en la solución con una turbidez estandarizada al 0,5 Mc Farland, a continuación, se realizó un estriado en varias direcciones, a continuación los discos a usar se colocaron en una caja Petri vacía y se los separó con anticipación para poder aplicar las soluciones empleadas en este estudio, cada solución se aplicó con una micropipeta, con la finalidad de que cada disco absorba un aproximado de 20 μ l de la sustancia aplicada.

Cuando los discos estuvieron embebidos con las respectivas sustancias, con la ayuda de una pinza metálica se los fue colocando en el agar, de forma equidistante de acuerdo a la rotulación previa; de la siguiente manera, en 15 placas Petri se colocaron cinco discos, tres con extracto etanólico de propóleo al 10%, 20% y 30%, uno con clorhexidina al 0,12% y uno con agua destilada. En las restantes 15 placas Petri se colocaron cinco discos, tres con extracto etanólico de té verde al 10%, 20% y 30%, uno con clorhexidina al 0,12% y uno con agua destilada. Los medios de cultivo fueron colocados en la campana de anaerobiosis, para ser llevado a la incubadora a 35 $^{\circ}$ C \pm 2 $^{\circ}$ C por 24 y 48 horas.

Pasadas las 24 y 48 horas se procedió a medir los halos de inhibición, generado por las diferentes concentraciones del té verde, propóleo y grupos controles, con la ayuda de una regla milimétrica.

Principios éticos. La presente investigación se desarrolló posterior a la aprobación por parte de la Comisión de Investigación de la Facultad de Odontología de la

Universidad Central del Ecuador; al no participar seres humanos y animales en ninguna fase del estudio, no implicó conflictos bioéticos por lo que el proyecto fue aprobado por la comisión de investigación y no requirió la evaluación del comité de ética de investigación en seres humanos; siguiéndose rigurosamente protocolos y normas de bioseguridad tanto para los investigadores como para el medio ambiente.

Análisis Estadístico. Los datos obtenidos se los registraron en tablas diseñadas para este estudio y el análisis estadístico al que se los sometió fue mediante el programa estadístico SPSS y a través de la prueba de normalidad Shapiro-Wilk, que determinó el tipo de datos a ser analizados y por tanto los análisis no paramétricos Kruskal-Wallis, Wilcoxon y U de Mann Whitney, fueron empleados para comparar la capacidad inhibitoria de las sustancias en sus tres diferentes concentraciones a las 24 y 48 horas, siguiendo lo reportado en estudios semejantes previos. Se consideró un nivel de significancia del 5%.

Resultados

Los resultados obtenidos detallan los valores en milímetros (mm) de los halos inhibitorios generados por los extractos etanólicos de té verde (*C. sinensis*) en concentraciones al 10, 20 y 30%, además de los halos generados por el control positivo que fue clorhexidina al 0,12% y el control negativo que fue agua destilada, sobre *S. mutans*; tanto a las 24 h como a las 48 h (Tabla 1).

El máximo halo inhibitorio que se obtuvo de las concentraciones del extracto de *C. sinensis* sobre *S. mutans* fue al 30%, tanto a las 24 y 48 horas reporta un promedio de 9,2 \pm 0,5 mm, seguido por la concentración al 20% (7,8 \pm 0,3 mm), con respecto a los grupos controles; la clorhexidina, control positivo, formó un halo de 15,6 \pm 0,6 mm y el agua destilada, control negativo, no formó halo inhibitorio, los 6 mm corresponden al diámetro del disco de papel (Tabla 2). Evidenciando que el efecto antibacteriano del extracto etanólico de *C. sinensis*, fue nulo en las concentraciones al 10 y 20%, a las 24 y 48 horas; mientras que en la concentración al 30%, el 6,6% tuvo un efecto nulo, pero el 93,3% fue sensible tanto a las 24 y 48 horas; la clorhexidina como control positivo tiene una sensibilidad alta, tanto a las 24 h como a las 48 h.

Valores en mm de los halos inhibitorios generados por los extractos etanólicos de propóleo en concentraciones al 10, 20 y 30%, además de los halos generados por el control positivo que fue clorhexidina al 0,12% y el control negativo que fue agua destilada, sobre *S. mutans*; tanto a las 24 h como a las 48 h (Tabla 3).

El máximo halo inhibitorio que se obtuvo de las concentraciones del extracto de propóleo sobre *S. mutans* fue al 30%, tanto a las 24 y 48 horas reporta un promedio y desviación estándar de 12 \pm 0,8 mm, seguido por la concentración al 20% (9,6 \pm 0,5 mm), con respecto a los grupos controles; la clorhexidina, control positivo,

Tabla 1. Halos inhibitorios en mm de *C. sinensis*, clorhexidina y agua destilada, sobre *S. mutans*

Sustancia antibacteriana Concentración	Extracto de <i>C. sinensis</i>						Clorhexidina 0,12%		Agua Destilada	
	10%		20%		30%		24h	48h	24h	48h
Muestras / Tiempo	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
1	8	8	8	8	9	9	15	15	6	6
2	7	7	8	8	9	9	16	16	6	6
3	7	7	8	8	9	9	15	15	6	6
4	7	7	7	7	9	9	16	16	6	6
5	7	7	8	8	8	8	15	15	6	6
6	7	7	8	8	10	10	16	16	6	6
7	7	7	8	8	9	9	15	15	6	6
8	6	6	8	8	9	9	15	15	6	6
9	7	7	8	8	10	10	16	16	6	6
10	6	6	7	7	9	9	17	17	6	6
11	7	7	8	8	9	9	15	15	6	6
12	7	7	8	8	9	9	16	16	6	6
13	7	7	8	8	10	10	16	16	6	6
14	8	8	8	8	9	9	16	16	6	6
15	7	7	8	8	10	10	15	15	6	6

Tabla 2. Estadística descriptiva de los halos de *C. sinensis*, clorhexidina y agua destilada

Extracto	Sustancia antibacteriana	Media	DE	IC al 95%	
				Mín.	Máx.
<i>C. sinensis</i> 10%	24 h	7,00	0,53	6,70	7,30
	48 h	7,00	0,53	6,70	7,30
<i>C. sinensis</i> 20%	24 h	7,87	0,35	7,67	8,06
	48 h	7,87	0,35	7,67	8,06
<i>C. sinensis</i> 30%	24 h	9,20	0,56	8,89	9,51
	48 h	9,20	0,56	8,89	9,51
Clorhexidina 0,12%	24 h	15,60	0,63	15,25	15,95
	48 h	15,60	0,63	15,25	15,95
Agua destilada	24 h	6,00	0,00	6,00	6,00
	48 h	6,00	0,00	6,00	6,00

DE: Desviación estándar

IC: Intervalo de confianza

Tabla 3. Halos inhibitorios en mm de propóleo, clorhexidina y agua destilada sobre *S. mutans*

Sustancia antibacteriana Concentración	Extracto etanólico de propóleo						Clorhexidina 0,12%		Agua Destilada	
	10%		20%		30%		24h	48h	24h	48h
Muestras / Tiempo	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
1	7	7	10	9	12	11	16	16	6	6
2	7	7	10	10	13	13	17	17	6	6
3	8	8	10	10	13	13	16	16	6	6
4	8	8	10	9	13	12	17	17	6	6
5	8	7	9	8	11	11	15	15	6	6
6	8	7	9	9	11	10	16	16	6	6
7	7	7	9	9	11	10	16	16	6	6
8	8	8	10	9	12	11	17	17	6	6
9	8	8	9	9	11	10	15	15	6	6
10	8	8	9	9	13	12	15	15	6	6
11	8	7	10	9	12	12	16	16	6	6
12	8	7	10	10	13	12	16	16	6	6
13	8	8	10	9	12	12	16	16	6	6
14	7	7	9	9	11	11	16	16	6	6
15	8	8	10	10	12	12	15	15	6	6

formó un halo de $15,9 \pm 0,7$ mm y el agua destilada, control negativo, no formó halo inhibitorio, los 6 mm corresponden al diámetro del disco de papel, se identificó que disminuye el halo de inhibición de la sustancia natural a las diferentes concentraciones al aumentar el tiempo de exposición a la bacteria (Tabla 4).

Se evidenció que el efecto antibacteriano del extracto etanólico de propóleo, fue nulo en la concentración al 10%, a las 24 y 48 horas; el 100% de las muestras en la concentración al 20% su efecto es sensible frente a *S. mutans* a las 24 horas, mientras que a las 48 horas disminuye al 93% de muestras como sensible y el 7% tiene un efecto nulo; el 100% de las muestras en la concentración al 30% su efecto es sensible frente a *S. mutans* a las 24 h y 48 h; la clorhexidina como control positivo tiene una sensibilidad alta, tanto a las 24 h como a las 48 h y el agua destilada tiene un efecto nulo.

Con la finalidad de determinar si las muestras provienen o no de una distribución normal, se realizó la prueba

de Shapiro-Wilk (Tabla 5) evidenciando que los datos no poseen una distribución normal, debido a que existe una variación significativa ($p < 0,001$). Considerando este resultado se emplearon pruebas no paramétricas, la prueba Wilcoxon se aplicó para comparar el efecto antibacteriano de los extractos etanólicos sobre *S. mutans* según el porcentaje de concentración, evidenciando que no existe diferencia significativa en el efecto antibacteriano de los extractos etanólicos, en las concentraciones al 10, 20 y 30% a las 24 h y 48 h, donde el $p > 0,05$ (Tabla 6). Para comparar los grupos experimentales se empleó la prueba Kruskal Wallis, demostrando que existe diferencia significativa entre los halos de inhibición de los extractos etanólicos en contraste con la clorhexidina 0,12% y agua destilada ($p < 0,001$) (Figura 1 A. B y 2 A. B).

Existe diferencia significativa entre el efecto de *C. sinensis* y la clorhexidina al 0,12%; de igual manera entre la concentración al 10% y 30% ($p > 0,05$), mientras que no

Tabla 4. Estadística descriptiva de los halos de propóleo, clorhexidina y agua destilada sobre *S. mutans*

Extracto	Sustancia antibacteriana	Media	DE	IC al 95%	
				Mín.	Máx.
Etanólico de propóleo 10%	24 h	7,733	0,458	7,480	7,987
	48 h	7,467	0,516	7,181	7,753
Etanólico de propóleo 20%	24 h	9,600	0,507	9,319	9,881
	48 h	9,200	0,561	8,890	9,510
Etanólico de propóleo 30%	24 h	12,000	0,845	11,532	12,468
	48 h	11,467	0,990	10,918	12,015
Clorhexidina 0,12%	24 h	15,933	0,704	15,544	16,323
	48 h	15,933	0,704	15,544	16,323
Agua destilada	24 h	6,000	0,000	6,000	6,000
	48 h	6,000	0,000	6,000	6,000

DE: Desviación estándar

IC: Intervalo de confianza

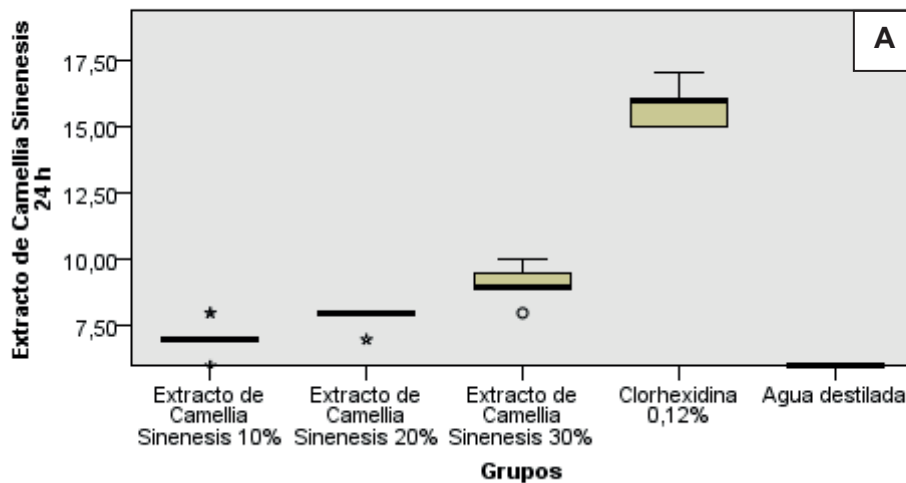
Tabla 5. Prueba de normalidad Shapiro-Wilk

Extracto	Tiempo	Shapiro-Wilk			
		Estadístico	gl	p-valor	
				<i>C. sinensis</i>	Etanólico de propóleo
Extracto 10%	24h	0,716	15	< 0,001	< 0,001
	48h	0,716	15	< 0,001	< 0,001
Extracto 20%	24h	0,413	15	< 0,001	< 0,001
	48h	0,413	15	< 0,001	0,001
Extracto 30%	24h	0,734	15	0,001	0,004
	48h	0,734	15	0,001	0,061
Clorhexidina 0,12%	24h	0,761	15	0,001	0,006
	48h	0,761	15	0,001	0,006
Agua destilada	24h		15	0,001	
	48h		15	0,001	

Tabla 6. Prueba Wilcoxon para comparar el efecto del extracto de *C. sinensis* y propóleo

Extracto	Tiempo	Camellia Sinensis		Etanólico de propóleo	
		Z	p-valor	Z	p-valor
Extracto 10%	48 h - 24 h	0,000	1,000	0,000	1,000
Extracto 20%	48 h - 24 h	0,000	1,000	-1,000	0,317
Extracto 30%	48 h - 24 h	0,000	1,000	0,000	1,000

Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes



Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes

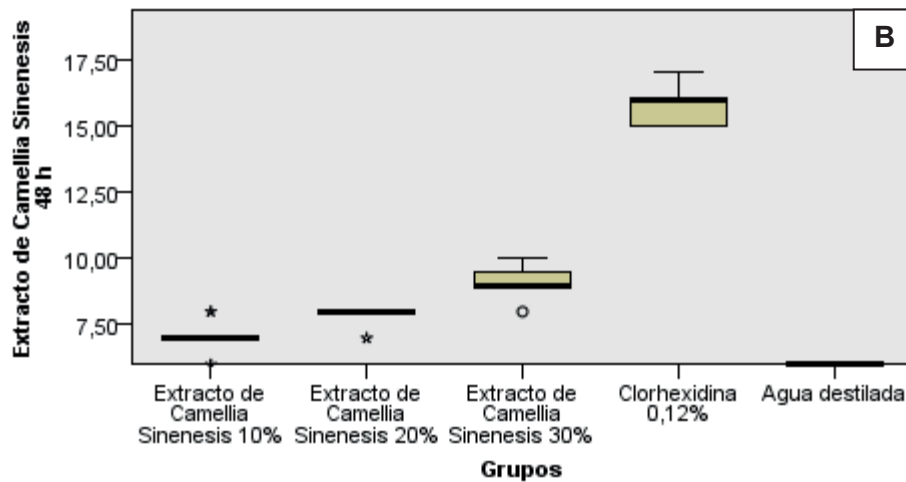


Figura 1. A. Prueba Kruskal Wallis para comparar los halos de inhibición del extracto etanólico de *C. sinensis* y los grupos control sobre *S. mutans* a las 24 horas y B. 48 horas

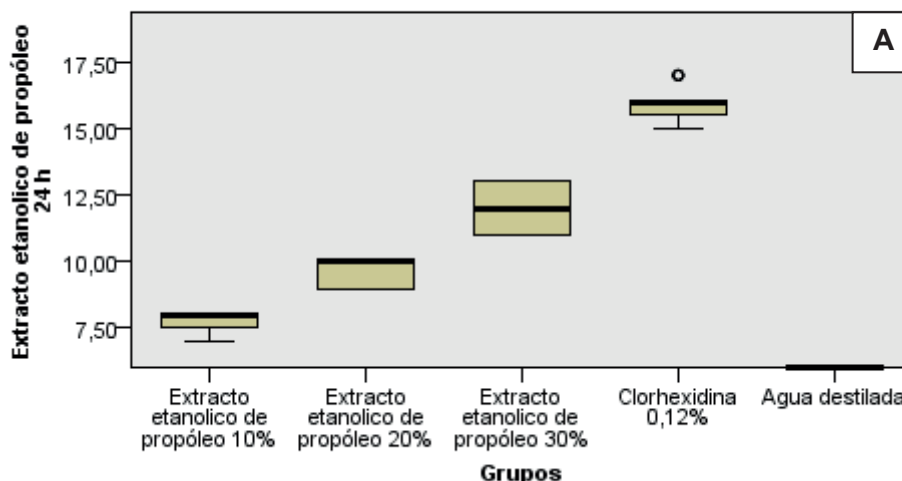
existió diferencia significativa entre las concentraciones al 10% y 20%, de igual manera con el agua destilada a las 24 y 48 horas (Tabla 7), con respecto al efecto antibacteriano del extracto etanólico de propóleo se evidenció una variación significativa ($p < 0,001$), excepto en las concentraciones al 20 y 30%, en los dos tiempos (Tabla 8). El análisis muestra que los extractos etanólicos independiente de su concentración generan efecto antibacteriano sobre *S. mutans* a las 24 y 48 horas, tomando en cuenta que el propóleo presentó mayor efecto antibacteriano que la *C. sinensis* (Tablas 7 y 8).

Discusión

Los resultados obtenidos muestran una diferencia significativa, el mayor halo inhibitorio del extracto etanólico de té verde (*C. sinensis*) frente a *S. mutans* fue en la concentración al 30% a las 24 h y 48 h, mientras que el mayor halo inhibitorio del extracto etanólico de

propóleo frente a *S. mutans*, fue en la concentración al 30% a las 24 h, por lo tanto los extractos naturales mostraron ser sensibles en la escala de Duraffourd y no superan la sensibilidad de la clorhexidina al 0,12%, no existen suficientes estudios en los que se evalúe el efecto antibacteriano del extracto etanólico de té verde y propóleo al 10, 20 y 30%, resultados similares fueron encontrados por Cayo y Cervantes 10, observando que el extracto etanólico de té verde (*C. sinensis*) al 20%, presentó diferencias estadísticamente significativas respecto al extracto etanólico de propóleo al 20%, tanto a las 24 h como a las 48 h, lo que permite relacionarlo con los resultados encontrados en la presente investigación, en las dos investigaciones se observa que el efecto antibacteriano del extracto etanólico de propóleo en su concentración máxima supera al efecto antibacteriano del extracto etanólico de té verde (*C. sinensis*), sin

Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes



Prueba de Kruskal-Wallis para muestras independientes

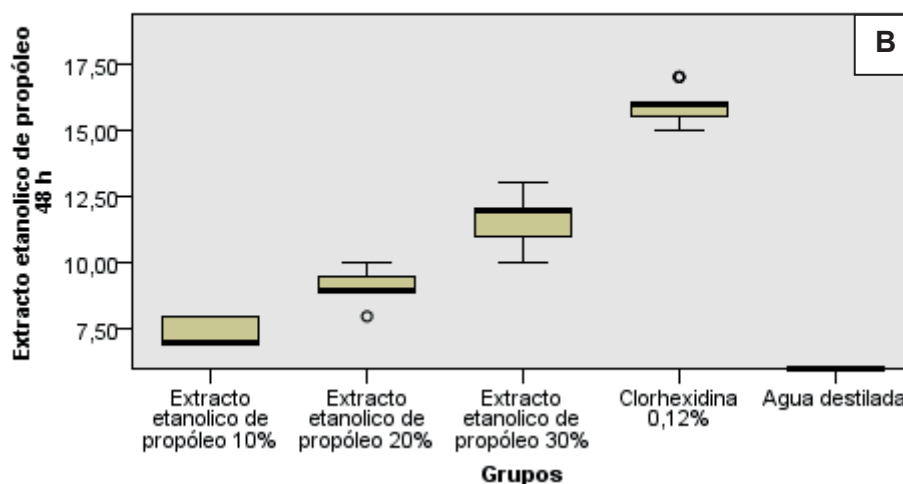


Figura 2. A. Prueba Kruskal Wallis para los halos de inhibición del extracto etanólico y los grupos control sobre *S. mutans* a las 24 y B. 48 horas

embargo ninguno supera el efecto antibacteriano de la clorhexidina.

Checalla y Sánchez 12, en su estudio emplearon extracto etanólico de propóleo en concentraciones al 25, 50, 75 y 100%, los resultados obtenidos mostraron que todas la concentraciones presentaron actividad antibacteriana frente a *S. mutans*, sin embargo la sustancia con mayor efecto antibacteriano fue la clorhexidina al 0,12%, a pesar de ser concentraciones distintas a las empleadas en el presente estudio, los resultados fueron similares, confirmándose que el extracto etanólico de propóleo independientemente de su concentración genera efecto antibacteriano frente a cepas de *S. mutans*, siendo un producto natural de interés para continuar estudiándolo, hasta obtener una concentración eficaz. La variación en los halos de ambos estudios puede deberse en primer lugar a las concentraciones utilizadas y en segundo lugar puede variar debido a la zona geográfica de

donde se obtuvo el propóleo, ratificando lo mencionado en el estudio de Liberio *et al.* 21, donde se menciona que las propiedades antibacterianas, varían según el lugar de origen, debido al tipo de flavonoides que presenten en su composición.

No existe gran cantidad de estudios sobre el efecto antibacteriano del extracto etanólico de té verde en distintas concentraciones, sin embargo, en el estudio de Hedge y Kamath 22, los resultados muestran que existió una disminución estadísticamente significativa de *S. mutans*, siendo mayor la disminución en el grupo en el que se aplicó clorhexidina al 0,12%, mientras que no existió diferencia estadísticamente significativa entre los grupos en los que se aplicó enjuague bucal con té verde al 0,5% y enjuague bucal combinado, tomando en cuenta que los resultados obtenidos fueron en UFC/mL (unidades formadoras de colonias/mililitros), consideran que el té verde puede ser considerado como alternativa a la

Tabla 7. Prueba U de Mann Whitney para comparar el efecto del extracto de *C. sinensis* con la Clorhexidina 0,12%

Tiempo	Extracto de <i>C. sinensis</i>		Diferencia de medias	IC del 95%		p-valor
				Mín.	Máx.	
24h	10%	20%	0,00	-0,12	0,12	1,000
		30%	-,93	-1,05	-0,82	<0,001
		Clorhexidina 0,12%	-2,00	-2,12	-1,88	<0,001
		Agua destilada	0,00	-0,12	0,12	1,000
	20%	30%	-,933	-1,05	-0,82	<0,001
		Clorhexidina 0,12%	-2,00*	-2,12	-1,88	<0,001
		Agua destilada	0,00	-0,12	0,12	1,000
		30%	Clorhexidina 0,12%	-1,06	-1,18	-0,95
		Agua destilada	,93	0,82	1,05	<0,001
48h	10%	20%	0,00	-0,12	0,12	1,000
		30%	-,933	-1,05	-0,82	<0,001
		Clorhexidina 0,12%	-2,00	-2,12	-1,88	<0,001
		Agua destilada	0,00	-0,12	0,12	<0,001
	20%	30%	-,93	-1,05	-0,82	<0,001
		Clorhexidina 0,12%	-2,00	-2,12	-1,88	<0,001
		Agua destilada	0,00	-0,12	0,12	1,000
		30%	Clorhexidina 0,12%	-1,06	-1,18	-0,95
		Agua destilada	,93	0,82	1,05	<0,001

IC: Intervalo de confianza

Tabla 8. Prueba U de Mann Whitney para comparar el efecto del extracto de etanólico de propóleo con la Clorhexidina 0,12%

Tiempo	Efecto del extracto etanólico de propóleo		Diferencia de medias	IC del 95%		p-valor
				Mín.	Máx.	
24h	10%	20%	-,93	-1,05	-0,82	<0,001
		30%	-1,00	-1,12	-0,88	<0,001
		Clorhexidina 0,12%	-2,00	-2,12	-1,88	<0,001
		Agua destilada	0,00	-0,12	0,12	1,000
	20%	30%	-0,06	-0,18	0,05	0,787
		Clorhexidina 0,12%	-1,06	-1,18	-0,95	<0,001
		Agua destilada	,93	0,82	1,05	<0,001
		30%	Clorhexidina 0,12%	-,93	-1,05	-0,82
		Agua destilada	-1,00	-1,12	-0,88	<0,001
48h	10%	20%	-,93	-1,05	-0,82	<0,001
		30%	-1,00	-1,12	-0,88	<0,001
		Clorhexidina 0,12%	-2,00	-2,12	-1,88	<0,001
		Agua destilada	0,00	-0,12	0,12	1,000
	20%	30%	-0,06	-0,18	0,05	0,787
		Clorhexidina 0,12%	-1,06	-1,18	-0,95	<0,001
		Agua destilada	,93	0,82	1,05	<0,001
		30%	Clorhexidina 0,12%	-,93	-1,05	-0,82
		Agua destilada	-1,00	-1,12	-0,88	<0,001

IC: Intervalo de confianza

clorhexidina, sin embargo con los resultados obtenidos en la presente investigación no es posible corroborar la conclusión mencionada, ya que hace falta más estudios para llegar a una conclusión definitiva, que pueda ser de uso para la comunidad científica.

En la investigación de Otake *et al.*²³, se demostró que la cantidad de catequinas presentes en una taza de té verde evita que el *S. mutans*, se adhiera a la superficie dental, además que se conoce que el té verde es rico en flúor, estos componentes ayudan a la remineralización de los dientes y evita el crecimiento bacteriano¹⁹, con estos antecedentes y los resultados obtenidos en la presente investigación se determina que el extracto etanólico de té verde si produce efecto antibacteriano, pero es necesario realizar más investigaciones para conocer la concentración adecuada, que pueda ser alternativa a sustancias como la clorhexidina.

Se concluye que el extracto etanólico de té verde (*C. sinensis*) frente a *S. mutans*, evidenció efecto antibacteriano en el 93,3% de las muestras en la concentración al 30%, tanto a las 24 horas como a las 48 horas, en el 6,6% el efecto antibacteriano fue nulo, al igual que en las concentraciones al 10 y 20%. El 100% de muestras con extracto etanólico de propóleo al 30%, presento efecto antibacteriano a las 24 horas y 48 horas, el 100% de muestras con extracto etanólico al 20% frente a *S. mutans*, evidencio efecto antibacteriano a las 24 horas, este efecto disminuye a las 48 horas, teniendo el 93% de muestras con efecto antibacteriano y un 7% con efecto antibacteriano nulo, al igual que el 100% de muestras en la concentración al 10%. Se recomienda realizar más investigaciones con extracto etanólico de propóleo y té verde (*C. sinensis*) en diferentes concentraciones a las utilizadas en la presente investigación, con la finalidad de generar mayor efecto inhibitorio.

El propóleo al 20 y 30% y la *C. sinensis* al 30%, podrían ser utilizados en la consulta odontológica, por su efecto antibacteriano, así como su posible uso como sustituto de sustancias químicas convencionales (clorhexidina), para evitar efectos secundarios ligados a estas, investigaciones complementarias en seres vivos requieren ser ejecutadas para verificar los resultados obtenidos.

Referencias

- García L, Tello G, Álvaro L. Caries Dental y Microbiota. *Rev Cient Odontol.* 2017;5(1):669-674. DOI: 10.21142/2523-2754-0501-2017-%25p
- Velazquez S, Martínez F. Microorganismos en la cavidad oral: microbiota y biopelículas. *Rev UP.* [Internet]. 2020 [citado el 24 de septiembre de 2021];249:18-23. Disponible en: <http://www.uaslp.mx/Comunicacion-Social/Documents/Divulgacion/Revista/Diecisisiete/249/249-04.pdf>
- Sarduy L, González M. La biopelícula: una nueva concepción de la placa dentobacteriana. *Rev Medico Electrónica* [Internet]. 2016 [citado el 24 de septiembre de 2021]; 20(3):167-175. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1029-30432016000300002&lng=es.
- Ojeda J, Oviedo E, Salas L. *S. mutans* y caries dental. *CES odontol.* [Internet]. 2013 [citado el 24 de septiembre de 2021];26(1):44-56. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-971X2013000100005&lng=en.
- Porte L, Braun S, Dabanch J, Egaña A, Andrighetti D. *S. mutans*: Una bacteria que hace honor a su nombre. *Rev Chilena infectol.* 2009;26(6):571. DOI: 10.4067/S0716-10182009000700017
- Gamboa F. Identificación y caracterización microbiológica, fenotípica y genotípica del *S. mutans*: experiencias e investigación. *Univ Odontol.* [Internet] 2014 [citado el 24 de septiembre de 2021]; 33(71):66-70. Disponible en: <https://revistas.javeriana.edu.co/index.php/revUnivOdontologica/article/view/14228>.
- Fernández A, Guevara S, Henckell C. Antisépticos orales: Clorhexidina, Flúor y Triclosán. *Rev Salud & Vida Sipanense.* [Internet] 2019 [citado el 24 de septiembre de 2021]; 6(2):4-14. Disponible en: <http://revistas.uss.edu.pe/index.php/SVS/article/view/1209/1028>.
- Bucio C, Martínez O. Actividad antibacteriana de un extracto acuoso de propóleo del municipio de Irapuato, Guanajuato, México. *Rev Agron Mesoam.* 2017;28(1):223-227. DOI: 10.15517/am.v28i1.24253
- Karadağlıoğlu Ö, Ulusoy N, Başer K, Hanoğlu A, Şik İ. Antibacterial Activities of Herbal Toothpastes Combined with Essential Oils against *S. mutans*. *Rev Pathogens.* 2019;8(20):1-17. DOI: 10.3390/pathogens8010020
- Cayo C, Cervantes L. La actividad antibacteriana de *C. sinensis* comparada con propóleo frente al *Streptococcus mutans*. *Rev Cubana Estomatol.* [Internet] 2020 [citado el 24 de septiembre de 2021]; 57(1):1-12 Disponible en: <http://www.revestomatologia.sld.cu/index.php/est/article/view/2967>
- Navarro J, Lezcano M, Mandri M, Gili M, Zamudio M. Acción Anticariogénica del propóleo. *Rev Ateneo Argent Odontol.* [Internet] 2018 [citado el 24 de septiembre de 2021];58(1):49-51. Disponible en: https://repositorio.unne.edu.ar/bitstream/handle/123456789/1606/RIUNNE_AR_Navarro-Lopez_JSA_01.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Checalla J, Sánchez M. Caracterización Química y Actividad Antibacteriana *in vitro* de un Extracto Etanólico de Propóleo Peruano Frente a *S. mutans*. *Int J Odontostomat.* 2021;15(1):145-151. DOI: 10.4067/S0718-381X2021000100145.
- Padrón A, Naranjo A, Díaz J, Llera R. El propóleo una alternativa de todos los tiempos. *Univ Méd Pinareña.* [Internet] 2012. [citado el 24 de septiembre de 2021]; 8(1):2-13 Disponible en: <http://www.revgaleno.sld.cu/index.php/ump/article/view/102>
- Huaytalla R, Gálvez C, Carhuapoma M, Álvarez M, López S. Efecto inhibitorio *in vitro* del extracto etanólico de propóleo al 15% y 30% frente a cepas de *Lactobacillus acidophilus*. *Rev Estomatol Herediana.* [Internet] 2018. [citado el 24 de septiembre de 2021]; 28(1):36-43. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1019-43552018000100005&lng=es.

15. Eguizábal M, Moromi H. Actividad antibacteriana *in vitro* del extracto etanólico de propoleo peruano sobre *S. mutans* y *Lactobacillus casei*. Odontol Sanmarquina. [Internet] 2007 [citado el 24 de septiembre de 2021]; 10(2):18-20. Disponible en: <https://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/odont/article/view/3028>
16. Valois de Sa T, Monteiro V, Sousa C, Costa C, Coelho C. Evaluación de la actividad antimicrobiana de los dentífricos basados en propóleos en patógenos orales. CES odontol. [Internet] 2020 [citado el 24 de septiembre de 2021]; 33(2):12-19. Disponible en: <https://revistas.ces.edu.co/index.php/odontologia/article/view/5169>
17. López M. El té verde. Rev Offarm. [Internet] 2002 [citado el 24 de septiembre de 2021]; 21(5):129-132. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-offarm-4-articulo-el-te-verde-13032231#:~:text=El%20uso%20del%20t%C3%A9%20verde,esta%20indicaci%C3%B3n%20tiene%20escaso%20fundamento>.
18. Mazur M, Ndokaj A, Jedlinski M, Ardan R, Bietolini S, Ottolenghi L. Impact of Green Tea (*C. Sinensis*) on periodontitis and caries. Systematic review and meta-analysis. J Jpn Dent Sci. 2020;57(1):1-11 DOI: 10.1016/j.jdsr.2020.11.003
19. Khurshid Z, Zafar M, Zohaib S, Najeeb S, Naseem M. Green Tea (*C. Sinensis*): Chemistry and Oral Health. Open Dent J. 2016;10:166-170. DOI: 10.2174/1874210601610010166.
20. Anita P, Sivasamy S, Madan P, Balan I, Ethiraj S. *In vitro* antibacterial activity of *C. sinensis* extract against cariogenic microorganisms. J Basic Clin Pharm. 2014;6(1):35-39. DOI: 10.4103/0976-0105.145777
21. Libério S, Pereira A, Araújo M, Dutra R, Nascimento F, Monteiro V, et al. The potential use of propolis as a cariostatic agent and its actions on mutans group streptococci. J Ethnopharmacol. 2009;125(1):1-9. DOI: 10.1016/j.jep.2009.04.047
22. Hegde R, Kamath S. Comparison of the *S. mutans* and *Lactobacillus* colony count changes in saliva following chlorhexidine (0.12%) mouth rinse, combination mouth rinse, and green tea extract (0.5%) mouth rinse in children. J Indian Soc Pedod Prev Dent. 2017;35(2):150-5. DOI: 10.4103/JISPPD.JISPPD_13_17
23. Otake S, Makimura M, Kuroki T, Nishihara Y, Hirasawa M. Anticaries effects of polyphenolic compounds from Japanese green tea. Caries Res. 1991;25(6):438-43. DOI: 10.1159/000261407